

Aurora Gimeno Soriano

# Receptores de la prostaglandina E2 implicados en los trastornos motores digestivos y la fiebre inducidos por endotoxinas en la oveja: Papel de los macrófagos

Departamento  
Farmacología y Fisiología

Director/es

Plaza Carrión, Miguel Ángel  
Castro López, Marta

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

RECEPTORES DE LA PROSTAGLANDINA E2  
IMPLICADOS EN LOS TRASTORNOS MOTORES  
DIGESTIVOS Y LA FIEBRE INDUCIDOS POR  
ENDOTOXINAS EN LA OVEJA: PAPEL DE LOS  
MACRÓFAGOS

Autor

Aurora Gimeno Soriano

Director/es

Plaza Carrión, Miguel Ángel  
Castro López, Marta

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Farmacología y Fisiología

2014



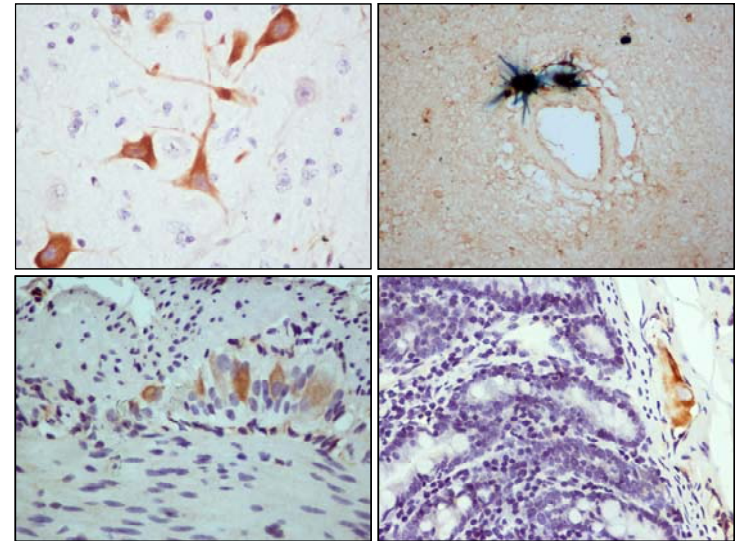
2014

Receptores de la prostaglandina E<sub>2</sub> implicados en los trastornos motores digestivos y la fiebre inducidos por endotoxinas en la oveja. Papel de los macrófagos.

Tesis Doctoral  
Aurora Gimeno

## TESIS DOCTORAL

**Receptores de la prostaglandina E<sub>2</sub>  
implicados en los trastornos motores  
digestivos y la fiebre inducidos por  
endotoxinas en la oveja. Papel de los  
macrófagos.**



AURORA GIMENO SORIANO  
2014







**Universidad  
Zaragoza**



**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA**  
**UNIDAD DE FISIOLOGÍA**

**Receptores de la prostaglandina E<sub>2</sub> implicados  
en los trastornos motores digestivos y la fiebre  
inducidos por endotoxinas en la oveja. Papel de  
los macrófagos.**

Memoria presentada por la Licenciada Aurora  
Gimeno Soriano para optar al grado de Doctor  
por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, Julio 2014





**Universidad  
Zaragoza**



**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y FISIOLOGÍA**  
**UNIDAD DE FISIOLOGÍA**

**MIGUEL ANGEL PLAZA CARRIÓN y MARTA CASTRO LÓPEZ**, Profesor Titular y Profesora Ayudante Doctor del Área de Fisiología, pertenecientes al Departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por **Aurora Gimeno Soriano**, con el título: **“Receptores de la prostaglandina E<sub>2</sub> implicados en los trastornos motores digestivos y la fiebre inducidos por endotoxinas en la oveja. Papel de los macrófagos.”**, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza. La memoria presentada se corresponde con el proyecto de tesis aprobado en su momento y cumple todas las condiciones exigidas, por lo que autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente en Zaragoza, a 19 de mayo de 2014.

Fdo. Miguel Angel Plaza Carrión

Fdo. Marta Castro López



*Desde estas líneas quiero expresar mi más sentida y sincera gratitud a todas aquellas personas que me han apoyado y ayudado en este tiempo, sin ellas hubiese sido del todo imposible afrontar con éxito la elaboración de este proyecto, en la que tanta ilusión he puesto. Una vez finalizada mi Tesis Doctoral, tengo la obligación de enfrentarme al capítulo más complicado de este trabajo, que no es otro que el de los agradecimientos.*

*En particular, mis agradecimientos van dirigidos a las siguientes personas:*

A mis directores de tesis, los Dres. Miguel Ángel Plaza Carrión y Marta Castro López. Gracias por vuestra guía y apoyo durante estos años, que tanto me ha enseñado en lo profesional y en lo personal.

A los profesores de la unidad de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, los Dres. María Pilar Arruebo Loshuertos, M<sup>a</sup> Divina Murillo López de Silanes, Laura Grasa López, Ana Isabel Alcalde Herrero, Jose Emilio Mesonero Gutiérrez, M<sup>a</sup> Jesús Rodríguez Yoldi y Jesus M<sup>a</sup> Muñoz Gil. Gracias por compartir conmigo estos años de trabajo, entre todos me habéis hecho sentir como en casa.

A los profesores de la Facultad de Veterinaria, los Dres. José Ignacio Bonafonte y Paco Vázquez, junto con todo su equipo del Servicio de Cirugía y Medicina Equina del Hospital Veterinario, por la realización de las intervenciones quirúrgicas y su inestimable apoyo, a las Dras. Carmen Arnal y Cristina Acín, por su importante colaboración en el estudio de las preparaciones histológicas, al Dr. Lluís Luján, por facilitarnos protocolos y material de inmunohistoquímica y a la Dra. Ana Cris Calvo, por estar siempre dispuesta a prestar su ayuda con los problemas en el *western blotting*. Agradecer a los Dres. Jesús Canudas y Daniel Insúa, del laboratorio Araclon Biotech, por haberme enseñado la técnica de la inmunohistoquímica doble.

A todos mis compañeros del laboratorio de Fisiología, con los que tan buenos momentos he pasado. A Ruth, Sergio, Carmen, Nyurky, Ligia, Alberto, Isabel, Fernando, Sabine, Eva, Elena, Sara, María José y, muy especialmente a Marta, que conmigo ha sido profesora pero, sobre todo, amiga. Gracias a mis compañeros mejicanos, Luis Fernando y Ana, por la ayuda prestada durante vuestra estancia. Gracias a Sonia, porque trabajar al lado de una buena amiga es un privilegio, gracias por tu apoyo. A todos, gracias por vuestra amistad y las horas juntos.

A las técnicas de laboratorio de la Unidad de Fisiología, Claudia Vergara y Ana de Prado, por toda la ayuda prestada y el trabajo a vuestro lado, que ha sido fundamental en este proyecto.

Al Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Zaragoza, especialmente a Sergio Alierta, Jesús Burillo y Josean. Gracias por vuestra importante labor en el cuidado y atención de los animales.

A nuestros compañeros del Departamento de Patología Animal, Luis Miguel Ferrer, Delia Lacasta y Belén Marín, por interesarse por la salud de nuestras ovejas.

A María José Pueyo, por su trabajo en las operaciones, su cordialidad y disposición en todo momento, a Charo Puyo, por incluir nuestras muestras en parafina y ayudarme con los cortes en el microtomo, a Santiago Becerra, por la realización de las necropsias de los animales y a Alba de Martino por la realización de los cortes histológicos más difíciles.

Al Gobierno de Aragón y a la Universidad de Zaragoza, organismos que han financiado este trabajo mediante proyectos de investigación, y me dieron la oportunidad de llevarlo a cabo gracias a la concesión de una beca predoctoral.

A mis amigas y compañeras de aventuras, Eva, Jessi, Noelia, Susana, Gema, Laura y Ana. Gracias por estar siempre ahí. En cada paso, os tengo a mi lado. A Maricarmen, por enseñarme a ver el mundo pintado de colores.

Y, finalmente, el último párrafo es el más especial para mi. Gracias a mi familia. A mis abuelos y a mi tío, por vuestro amor y entrega; a mi hermano Eduardo, que ha ido creciendo a la par que este trabajo, llenándome de orgullo. A mis padres, mis mejores profesores, gracias a vosotros he aprendido la lección más importante de la vida. Gracias por auparme en cada paso e ir juntos de la mano. Y a Jonathan, mi mejor amigo y compañero en la vida, por estar ahí en los momentos buenos y malos, gracias por saber sacarme siempre una sonrisa.

**A todos vosotros, gracias.**

“Hay una fuerza motriz más  
poderosa que el vapor, la  
electricidad y la energía atómica: la  
voluntad”.

**Albert Einstein** (1879-1955).  
*Científico.*

“Las ideas no duran mucho; hay  
que hacer algo con ellas”.

**Santiago Ramón y Cajal** (1852-  
1934).  
*Premio Nobel de Medicina (1906).*

“Las ciencias tienen las raíces  
amargas, pero muy dulces los  
frutos”.

**Aristóteles** (384-322 AC).  
*Filósofo griego.*

“¡Feliz el que ha llegado a conocer  
las causas de las cosas”.

**Virgilio** (70-19 AC).  
*Poeta latino.*

**A mi familia, por vuestro apoyo incondicional**





Este trabajo ha sido realizado con cargo a los Proyectos de Investigación financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2006-04317/GAN), el Gobierno de Aragón (B61, CTPP10/11, I-2011/017) y la Universidad de Zaragoza (UZ2010-BIO-13, UZ2009-BIO-03).

La autora de la tesis recibió una beca predoctoral del Gobierno de Aragón (ref. B090/2009).



<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1.- Anatomía del tracto gastrointestinal (GI) de la oveja	3
1.1.1.- Estómago	3
1.1.2.- Intestino delgado	3
1.1.3.- Intestino grueso	4
1.1.4.- Inervación y vascularización	6
1.2.- Áreas y núcleos hipotalámicos	7
1.3.- Histología del tubo digestivo, hígado, pulmón, hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja	11
1.3.1.- Tubo digestivo	11
1.3.1.1.- Mucosa	11
1.3.1.2.- Submucosa	13
1.3.1.3.- Muscular	13
1.3.1.4.- Serosa	14
1.3.2.- Hígado	15
1.3.3.- Pulmón	17
1.3.4.- Hipotálamo y bulbo raquídeo	18
1.4.- Motilidad del tracto GI	19
1.4.1.- Estructura de la célula muscular lisa GI	19
1.4.2.- Mecanismo de la contracción y relajación muscular	20
1.4.3.- Actividad eléctrica del músculo liso GI: las ondas lentas	21
1.4.4.- El complejo motor (o mioeléctrico) migratorio (MMC)	22
1.4.5.- Características de la actividad motora GI en la oveja	25
1.4.6.- Regulación de la motilidad GI	27
1.4.7.- El sistema inmunitario como regulador de la actividad GI	29
1.5.- El lipopolisacárido (LPS) y las citocinas	30
1.5.1.- La pared celular de las bacterias Gram negativas	30
1.5.2.- Estructura del LPS	32
1.5.3.- Las citocinas	33
1.5.4.- Efectos producidos por el LPS y las citocinas	33
1.6.- Las prostaglandinas (PGs)	38
1.6.1.- Papel de las PGs en la fisiopatología del tracto GI y en la fiebre	40
1.7.- Receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs)	43
1.7.1.- Distribución de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs)	48
1.8.- Macrófagos como moduladores de la inmunidad	50
1.8.1.- Macrófagos hepáticos y pulmonares	50
1.8.2.- Microglía o macrófagos cerebrales	52

<b>2.- OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>59</b>
3.1.- Animales y mantenimiento	61
3.2.- Estudios de motilidad gastrointestinal <i>in vivo</i>	62
3.2.1.- Procedimiento quirúrgico	62
3.2.2.- Registros de la temperatura corporal	65
3.2.3.- Registros electromiográficos	65
3.2.4.- Análisis de la señal electromiográfica	67
3.2.5.- Administración de los agentes	68
3.2.6.- Diseño experimental	69
3.2.7.- Agentes ensayados	69
3.3.- Obtención de las muestras para inmunohistoquímica y <i>western blotting</i>	70
3.4.- Estudios de <i>western blotting</i> (WB)	71
3.4.1.- Homogeneización de las muestras	71
3.4.2.- Cuantificación de proteínas	72
3.4.3.- Preparación de las muestras	73
3.4.4.- Detección y cuantificación de las COX y los receptores de la PGE <sub>2</sub>	73
3.4.5.- Detección y cuantificación de $\beta$ -actina y GAPDH	78
3.5.6.- Análisis de las bandas obtenidas por WB	78
3.5.- Estudios de inmunohistoquímica (IHC)	79
3.5.1.- Doble inmunohistoquímica	82
3.6.- Tratamiento estadístico	83
<b>4.- RESULTADOS</b>	<b>85</b>
4.1.- Efecto del clorhexahidrato de gadolinio (III) y del tiloxapol sobre las alteraciones inducidas por el LPS	87
4.1.1.- Motilidad gastrointestinal (GI) en la oveja en periodo control	87
4.1.2.- Efectos del LPS sobre la temperatura corporal y la motilidad GI en la oveja	87
4.1.3.- Efecto del clorhexahidrato de gadolinio (III) y del tiloxapol sobre las alteraciones inducidas por el LPS	90
4.2.- Expresión de la COX-1 y la COX-2 en el sistema nervioso central de la oveja	92
4.3.- Efecto del LPS sobre la expresión de la COX-1 y la COX-2 en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja	101
4.4.- Identificación de las células productoras de COX en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja	101
4.5.- Expresión de la COX-1 y la COX-2 en tejidos periféricos (hígado y pulmón) de la oveja	110
4.6.- Efecto del LPS sobre la expresión de la COX-1 y la COX-2 en los tejidos periféricos (hígado y pulmón) de la oveja	118

4.7.- Identificación de las células productoras de COX en los tejidos periféricos (hígado y pulmón) de la oveja .....	118
4.8.- Efecto de los agonistas de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs) sobre la fiebre y las alteraciones motoras GI en la oveja .....	124
4.8.1.- Efecto del agonista EP <sub>3</sub> Sulprostona .....	124
4.8.2.- Efecto del agonista EP <sub>1</sub> 17-fenil-trinor PGE <sub>2</sub> .....	126
4.8.3.- Efecto del agonista EP <sub>2</sub> Butaprost .....	128
4.8.4.- Efecto del agonista EP <sub>4</sub> L-902,688 .....	129
4.9.- Expresión de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs) en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja .....	132
4.10.- Expresión de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs) en el tracto GI de la oveja .....	143
4.11.- Efecto del LPS sobre la expresión de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs) en el hipotálamo, bulbo raquídeo y el tracto GI de la oveja .....	160
<b>5.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>161</b>
5.1.- Papel de las ciclooxigenasas (COX) en la fiebre y las alteraciones motoras GI inducidas por el LPS .....	163
5.1.1.- Expresión de las COX en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja y su papel en los efectos inducidos por el LPS .....	163
5.1.2.- Expresión de las COX en tejidos periféricos (hígado y pulmón) de la oveja y su papel en los efectos inducidos por el LPS .....	167
5.2.- Papel de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EP <sub>1</sub> , <sub>2</sub> , <sub>3</sub> y <sub>4</sub> ) en la fiebre y las alteraciones motoras gastrointestinales (GI) inducidas por el LPS .....	174
5.2.1.- Expresión de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs) en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja .....	175
5.2.2.- Expresión de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs) en el tracto GI de la oveja .....	176
5.2.3.- Efecto del LPS en la expresión de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs) en el hipotálamo y bulbo raquídeo .....	179
5.2.4.- Efecto del LPS en la expresión de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs) en el tracto GI .....	180
5.2.5.- Participación de los receptores de la PGE <sub>2</sub> (EPs) en la fiebre y las alteraciones motoras GI inducidas por el LPS .....	182
<b>6.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>189</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>193</b>

## **1.- INTRODUCCIÓN**





## 1.1 ANATOMÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE LA OVEJA

### 1.1.1 ESTÓMAGO

El estómago de los rumiantes es muy voluminoso (3/4 partes de la cavidad abdominal) y pluricavitario, estando dividido en 4 compartimientos bien diferenciados: retículo, rumen, omaso y abomaso (Fig. 1.1). Los tres primeros se denominan preestómagos y están recubiertos internamente por un epitelio escamoso estratificado aglandular (en ellos no se segregan ni moco ni jugos gástricos). El abomaso es la parte glandular, semejante al estómago de los monogástricos.

El **retículo**, situado en la parte anterior, está separado del rumen por el pliegue retículo-ruminal, formando con él una unidad funcional, ya que dichas estructuras se comunican internamente por la parte superior.

El **rumen** es el compartimento más voluminoso y está en contacto con la pared abdominal izquierda. Está dividido a su vez en varios sacos (saco craneal, saco dorsal, saco ventral, saco ciego dorsal y saco ciego ventral).

El **omaso**, situado en la parte derecha, está conectado al retículo por el orificio retículo-omasal y al abomaso por el orificio omaso-abomasal.

El **abomaso** es el estómago glandular de los rumiantes. Morfológicamente, es un saco alargado, que asienta fundamentalmente en el suelo abdominal de la zona derecha. En él se distinguen tres zonas: *fundus*, cuerpo y antro pilórico. El interior del abomaso está tapizado por una mucosa glandular, dispuesta a modo de pliegues espirales para aumentar su superficie y posee las mismas características de las regiones glandulares de otros mamíferos. La mayor parte de la mucosa abomasal se encuentra ocupando el *fundus* y el cuerpo y está destinada a la secreción de pepsinógeno y ácido clorhídrico principalmente. La zona antral es más reducida y en su parte final la capa de tejido muscular circular se engrosa, formando el esfínter pilórico.

### 1.1.2 INTESTINO DELGADO

El intestino delgado es una estructura tubular continua, que se divide en tres partes: duodeno, yeyuno e íleon (Fig. 1.2). Posee una longitud de unos 25 metros en la oveja y el promedio de su diámetro es de 2 a 3 cm en pequeños rumiantes. Se caracteriza por pliegues permanentes de la mucosa y por la presencia de vellosidades. Las glándulas duodenales están presentes en los primeros 60-70 cm. Los agregados de nódulos linfáticos o placas de Peyer son grandes y tienen la forma de bandas estrechas.

El **duodeno** tiene alrededor de 70 cm de longitud. Comienza en el píloro y la parte craneal pasa dorsalmente a la superficie visceral del hígado, donde forma una curva en forma de S denominada asa sigmoidea. La segunda porción, denominada duodeno descendente, se dirige horizontalmente hacia atrás, casi a nivel de la tuberosidad coxal y luego se incurva de nuevo hacia delante para formar la flexura iliaca. En esta porción descendente desemboca el conducto pancreático y biliar común, a unos 25-40 cm del píloro. La tercera porción, llamada duodeno ascendente, se dirige hacia delante sobre el lado interno del duodeno descendente, dando lugar a una segunda curva similar a una S, en el extremo posterior del riñón derecho, para continuar posteriormente con el yeyuno.

El **yeyuno** forma numerosos pliegues dispuestos alrededor del borde del mesenterio. Caudalmente, antes de unirse al íleon, se prolonga en una serie de asas en forma de U sobre una extensión del mesenterio. Se asienta por regla general sobre el receso supraomental al lado derecho del rumen.

El **íleon** es la parte terminal del intestino delgado, que finaliza en el orificio ileocecal. Alrededor de dicho orificio, la mucosa hace prominencia y posee numerosos nódulos linfáticos agregados. Su parte craneal se adhiere al ciego y colon.

### 1.1.3 INTESTINO GRUESO

A diferencia de otras especies, el intestino grueso de los rumiantes no posee bandas longitudinales ni saculaciones. A excepción del extremo libre del ciego, está situado, junto con el intestino delgado, en el receso supraomental. A nivel histológico no posee vellosidades, sino pliegues de la mucosa de forma semicircular y se observa comparativamente al intestino delgado, un aumento de las células caliciformes. En él se distinguen tres zonas: ciego, colon y recto (Fig. 1.2).

El **ciego** tiene una capacidad de 1,5 litros con una longitud media de 30 cm y un diámetro de 8 cm. Se extiende desde 8 cm detrás de la cara visceral derecha del hígado, hasta la cavidad pelviana.

El **colon** de la oveja mide entre 4 y 5 m, con un diámetro que va disminuyendo gradualmente en toda su longitud desde 8 a 2 cm. Comienza como una continuación directa del ciego en el orificio ileocecal y se pueden distinguir en él tres partes: colon ascendente, transversal y descendente. El colon ascendente es muy largo en los rumiantes ya que posee numerosas asas y pliegues centrípetos y centrífugos. El colon descendente está unido a la región sublumbar y porción ascendente del duodeno.

Por último el **recto**, que se extiende desde el promontorio sacro hasta el límite entre la 2ª y la 3ª vértebra coccígea y está formado por una zona craneal cubierta por peritoneo y otra retroperitoneal más ancha, denominada ampolla rectal.

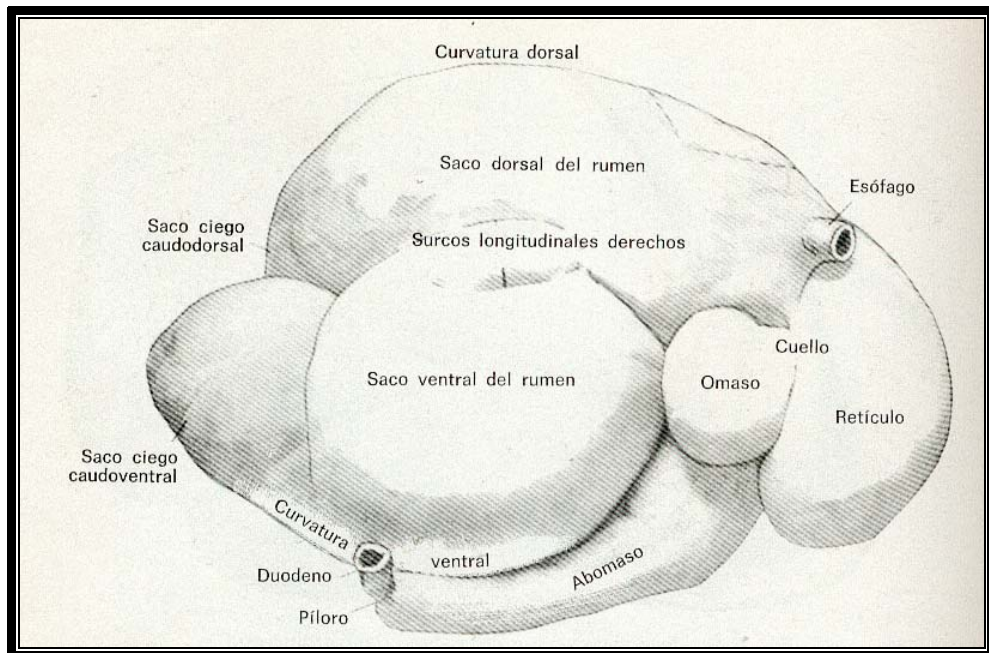


Figura 1.1.- Estómago de la oveja; lado derecho (procedente de una muestra fijada *in situ*. Línea de trazos: posición del bazo). Tomada de Sisson y cols., 1998.

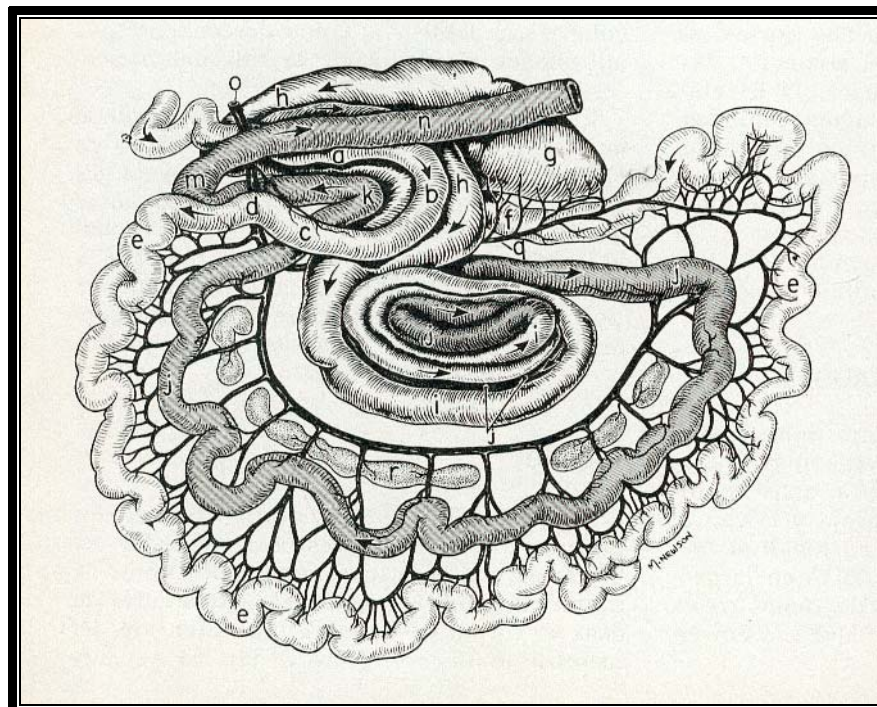


Figura 1.2.- Intestino de la oveja; lado izquierdo. a, duodeno descendente; b, flexura caudal del duodeno; c, duodeno ascendente; d, flexura duodeno-yeyunal; e, yeyuno; f, íleon; g, ciego; h, asa proximal del colon; i, giro centrípeto; j, giro centrífugo; k, asa proximal del colon; m, colon transversal; n, colon descendente; o, arteria mesentérica craneal; q, arteria cecal; r, linfáticos mesentéricos. Tomada de Habel, 1956.

### 1.1.4 INERVACIÓN Y VASCULARIZACIÓN

El sistema nervioso autónomo inerva el intestino y las glándulas mayores. La inervación parasimpática del estómago de los rumiantes se realiza a través del nervio vago, que en la cavidad torácica se encuentra dividido en un tronco vagal dorsal y en un tronco vagal ventral (Fig. 1.3). La inervación simpática es de menor importancia funcional y procede de los plexos celiaco, mesentérico caudal y lumbar.

Las arterias que llevan sangre al estómago de los rumiantes proceden de la arteria celiaca y la sangre venosa, es recogida por la vena esplénica y la gastroduodenal, que desembocan en la vena porta. La parte inicial del duodeno recibe sangre arterial a partir de la arteria celiaca. El resto del intestino delgado así como la mayor parte del intestino grueso está irrigado a partir de la arteria mesentérica craneal. El colon descendente y parte del recto por la arteria mesentérica caudal y la otra porción del recto recibe además irrigación por parte de las arterias ilíacas internas. Todo el intestino, a excepción de la última porción, drena su sangre venosa hacia la vena porta.

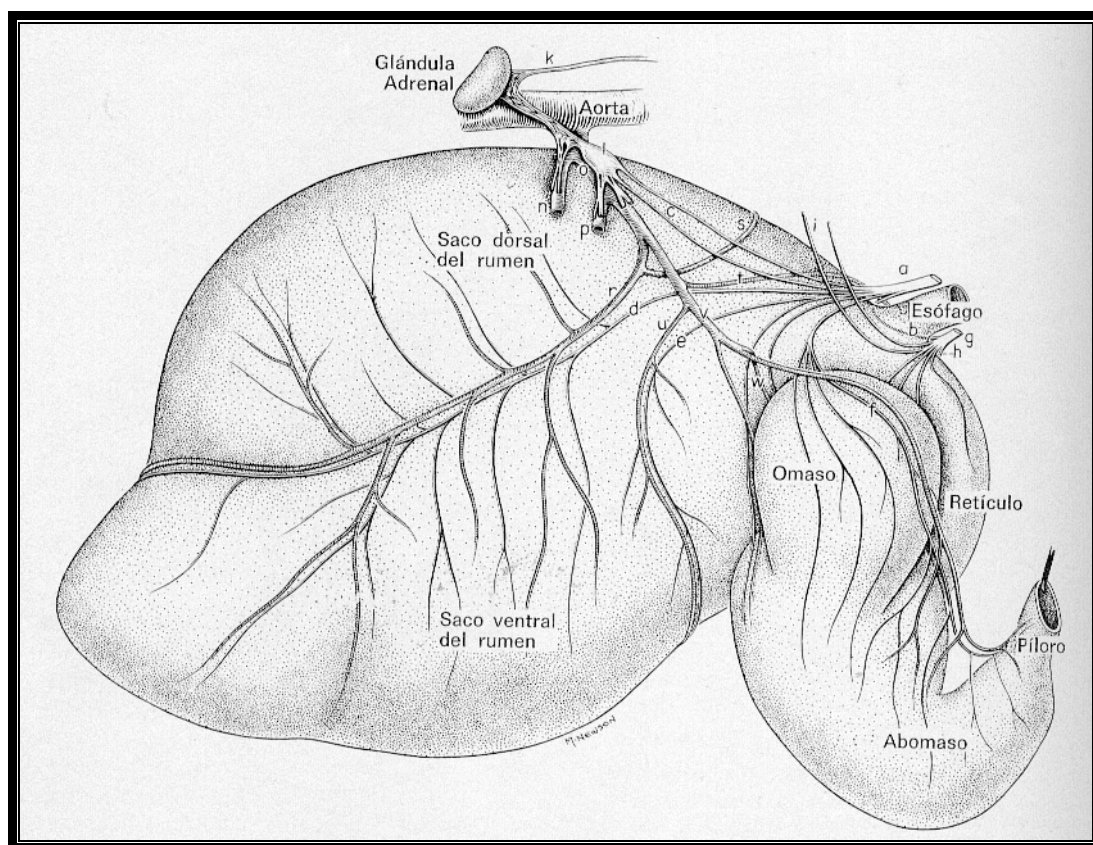


Figura 1.3.- Tronco vagal dorsal de la oveja; lado derecho. El omaso y abomaso se han dirigido hacia delante. No se presenta el tronco simpático sobre las arterias gástricas. a, tronco vagal dorsal; b, rama comunicante entre los troncos vagales; c, ramas al plexo celiaco; d, rama ruminal derecha; e, rama al plexo sobre la arteria ruminal izquierda; f, continuación del tronco vagal dorsal; g, tronco vagal ventral; h, rama al lado izquierdo del atrio del rumen; j, ramas hepática y pilórica larga; k, gran nervio esplácnico; l, ganglio celiaco-mesentérico; n, arteria mesentérica craneal; o, arteria celiaca; p, arteria hepática; r, arteria ruminal derecha; s, arteria esplénica; t, arteria reticular; u, arteria reticular izquierda; v, arteria gástrica izquierda; w, arteria gastroepiploica izquierda. Tomada de Habel, 1956.

## 1.2 ÁREAS Y NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS

El hipotálamo constituye el centro principal de gobierno de las funciones homeostáticas, estando organizado mediante conexiones aferentes y eferentes para controlar funciones autonómicas, neuroendocrinas y somáticas. Así, tiene gran importancia en la regulación de la presión arterial, la sed y la conservación del agua, la regulación térmica y el control endocrino.

El hipotálamo está dividido en una zona anterior y en una zona posterior (Figs. 1.4 a 1.7). En la zona anterior se localizan el área preóptica y los núcleos paraventricular y supraóptico. En la zona posterior se localizan los núcleos dorsomedial, peritrigonal, ventromedial, infundibular y posterior, así como el cuerpo mamilar (Fig. 1.4). Además, a cada lado del hipotálamo existe un gran área hipotalámica lateral, la cual reviste especial importancia para controlar la sed, el hambre y muchos de los impulsos emocionales. Estas áreas laterales están conectadas de forma recíproca con la porción superior del tronco encefálico y estructuras límbicas superiores.

El hipotálamo está implicado en el control de las siguientes funciones vegetativas:

- **Regulación cardiovascular:** La estimulación de diferentes áreas por todo el hipotálamo puede causar cualquier tipo de efecto neurogénico sobre el sistema cardiovascular. En general, la estimulación del hipotálamo posterior y lateral aumenta la presión arterial y la frecuencia cardíaca, mientras que la estimulación del área preóptica tiene frecuentemente los efectos opuestos.

- **Regulación de la temperatura corporal:** La porción anterior del hipotálamo, especialmente el área preóptica, se ocupa de la regulación de la temperatura. El aumento de la temperatura de la sangre que fluye a través de esta área eleva la actividad de las neuronas sensibles a la temperatura, mientras que un descenso de la temperatura disminuye su actividad. A su vez, estas neuronas controlan los mecanismos que incrementan o reducen la temperatura corporal.

- **Regulación del agua corporal:** El hipotálamo regula el agua corporal provocando la sensación de sed y controlando la excreción de agua por la orina. El centro de la sed se sitúa en el hipotálamo lateral. Cuando los electrolitos del interior de las neuronas de este centro o de las áreas relacionadas del hipotálamo se concentran en exceso, surge en el animal un intenso deseo de beber agua. El control de la excreción renal de agua depende, en esencia, del núcleo supraóptico: cuando los líquidos corporales se concentran demasiado, las neuronas de esta área se estimulan. Las fibras nerviosas procedentes de estas neuronas se proyectan hacia la parte posterior de la hipófisis a través del infundíbulo del hipotálamo, donde las terminaciones nerviosas segregan hormona antidiurética o vasopresina. Esta

hormona pasa a la sangre y actúa sobre los túbulos colectores renales provocando una reabsorción masiva de agua y favorece la excreción continua de electrolitos.

- **Regulación de la contractilidad uterina y de la expulsión de leche por las mamas:** La estimulación del núcleo paraventricular hace que las neuronas segreguen la hormona oxitocina. Esto provoca un aumento de la contractilidad del útero y de las células mioepiteliales que rodean los alvéolos de las mamas y que eliminan leche a través de los pezones.

- **Regulación de la función gastrointestinal y de la ingesta:** La estimulación de varias áreas del hipotálamo induce hambre. El área más asociada al hambre es el área hipotalámica lateral. El centro que se opone al deseo de comida, localizado en el núcleo ventromedial, se denomina centro de la saciedad. Otra zona del hipotálamo que participa en el control general de la actividad gastrointestinal son los cuerpos mamilares, que controlan, al menos en parte, muchos reflejos relacionados con la alimentación, como lamerse los labios o deglutir.

- **Reflejo ruminal:** La rumia es un reflejo vago-vagal gobernado por los centros gástricos del bulbo raquídeo y por las áreas hipotalámicas anterior y ventral. Para poder cumplir las funciones propias de la rumia, de las cuales depende la actividad fermentativa y la propia nutrición del rumiante, los preestómagos poseen una actividad motora controlada. Este control lo realiza un centro nervioso ubicado en el núcleo vagal dorsal del tronco encefálico (bulbo raquídeo), el cual envía información eferente a través del nervio vago para regular los movimientos ruminales (Guyton, 2001).

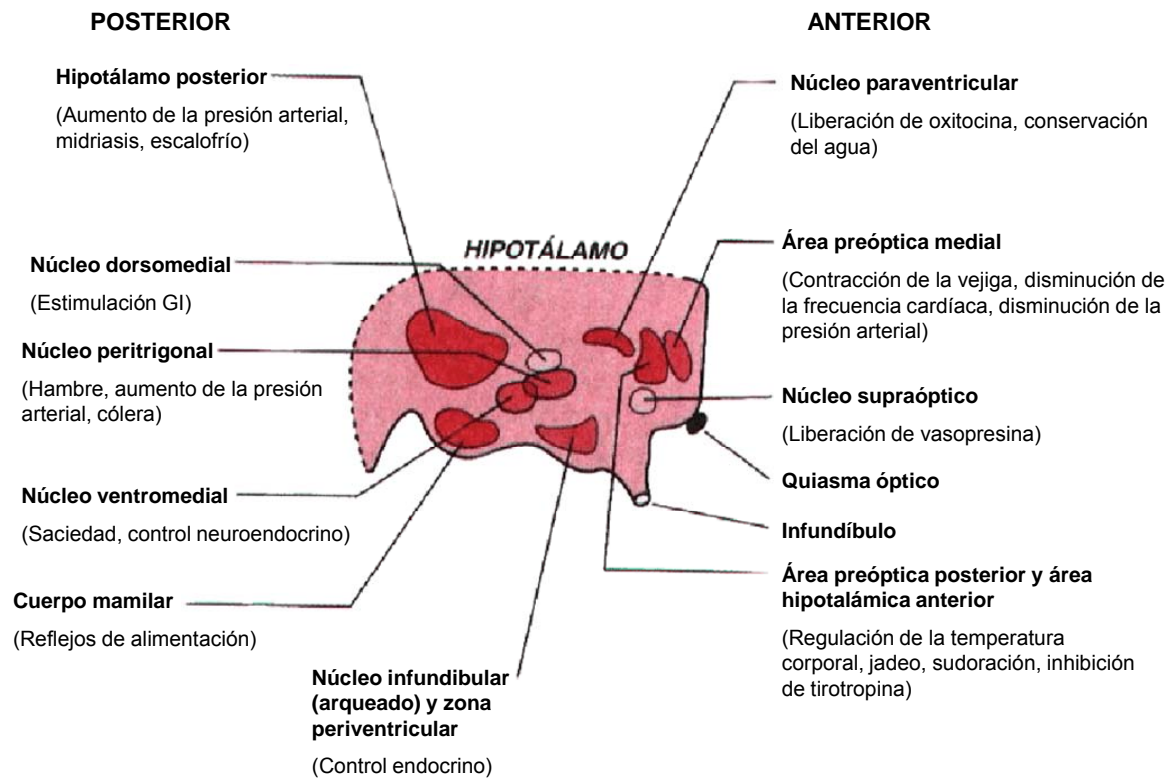


Figura 1.4.- Centros de control del hipotálamo (visión sagital). Tomada de Guyton, 10ª ed. (2001).



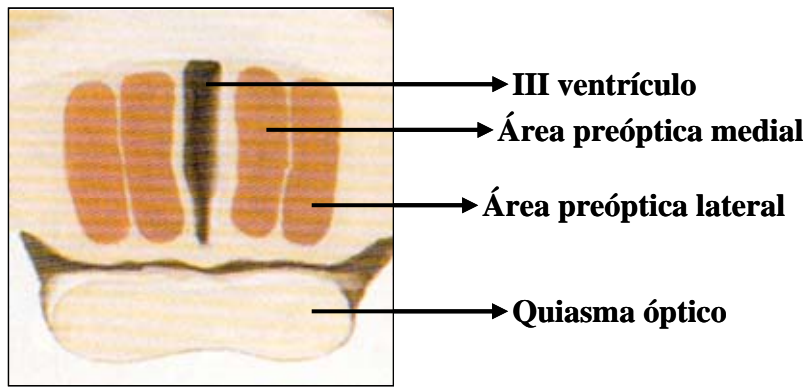


Figura 1.5.- Corte transversal del hipotálamo anterior. Modificada de netterimages.com.

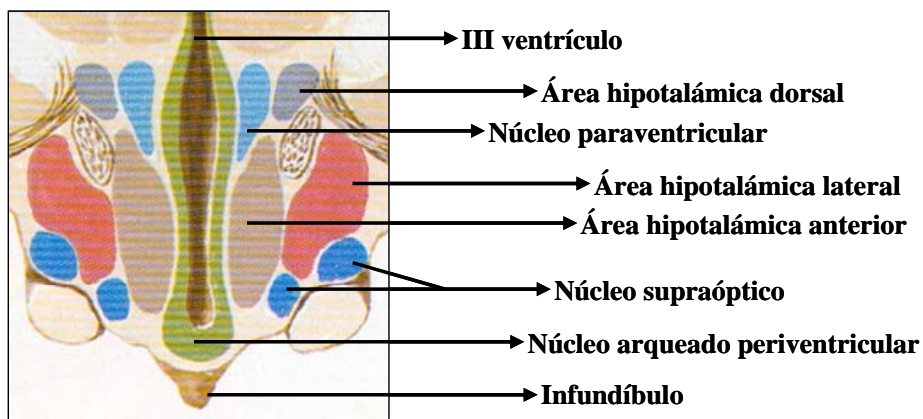


Figura 1.6.- Corte transversal de la zona media del hipotálamo. Modificada de netterimages.com.

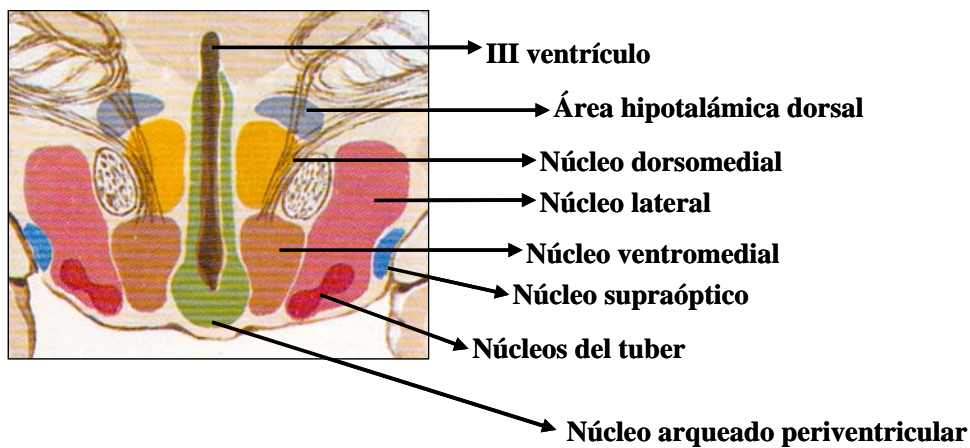


Figura 1.7.- Corte transversal del hipotálamo posterior. Modificada de netterimages.com.



### 1.3 HISTOLOGÍA DEL TUBO DIGESTIVO, HÍGADO, PULMÓN, HIPOTÁLAMO Y BULBO RAQUÍDEO DE LA OVEJA

#### 1.3.1 TUBO DIGESTIVO

Histológicamente, el tracto gastrointestinal (GI) se caracteriza por la presencia de distintas capas, que desde el interior al exterior, son la mucosa, submucosa, muscular y serosa (Figs. 1.8 a 1.12).

##### 1.3.1.1 MUCOSA

Es la capa más interna y está integrada por el epitelio de revestimiento (responsable de todos los fenómenos de absorción y secreción), la lámina propia (rica en fibras colágenas) y la *muscularis mucosae* (delgada capa de células musculares lisas).

La mucosa del **rumen** está recubierta por un epitelio estratificado plano. La capa superficial queratinizada del epitelio actúa de superficie protectora contra la ingesta fibrosa, mientras que las capas más profundas metabolizan los ácidos grasos volátiles de cadena corta, principalmente butírico, propiónico y acético, productos de la fermentación. A través del epitelio se absorben los ácidos grasos volátiles, sodio, potasio, amonio y otras sustancias del contenido ruminal. Las capas del epitelio estratificado plano del rumen son (de basal a apical) (Fig. 1.9):

- *Estrato basal*: presenta una alta actividad mitótica, con células muy diferenciadas hacia la división celular.
- *Estrato espinoso*: formado por células con abundantes uniones desmosómicas, y con unas espículas características que dan nombre al estrato.
- *Estrato granuloso*: células aplanadas con gránulos de queratohialina, precursor de la queratina.
- *Estrato lúcido*: contiene células planas con grandes depósitos de queratina. Las células todavía muestran núcleos.
- *Estrato córneo*: integrado por células anucleadas y muy planas dispuestas a modo de escamas.

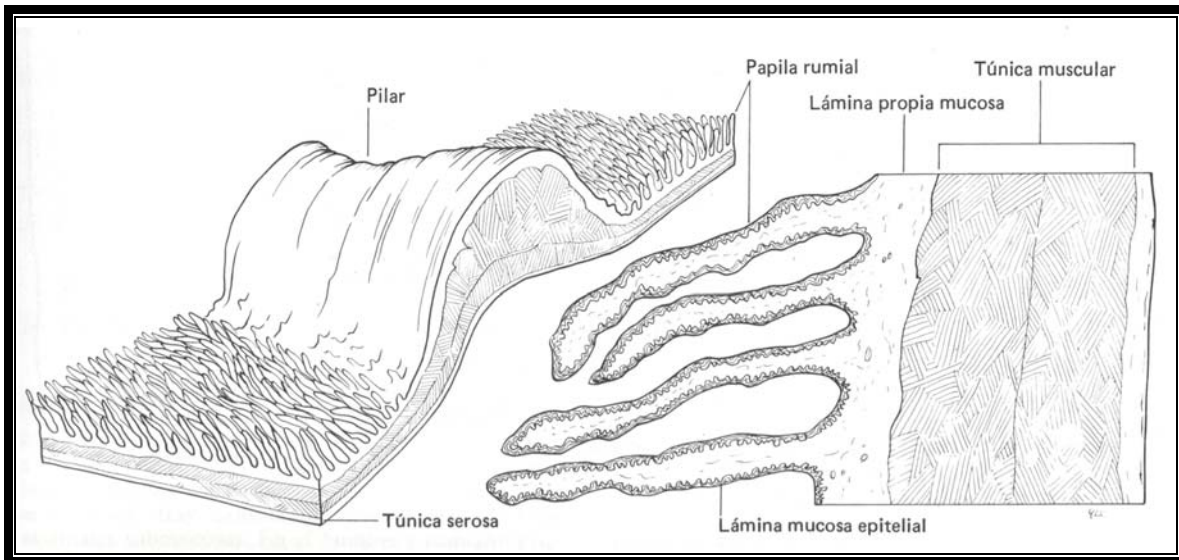


Figura 1.8.- Esquema histológico de la pared del rumen, en la que se muestran las diversas capas que lo forman. Tomada de Banks, 1986.

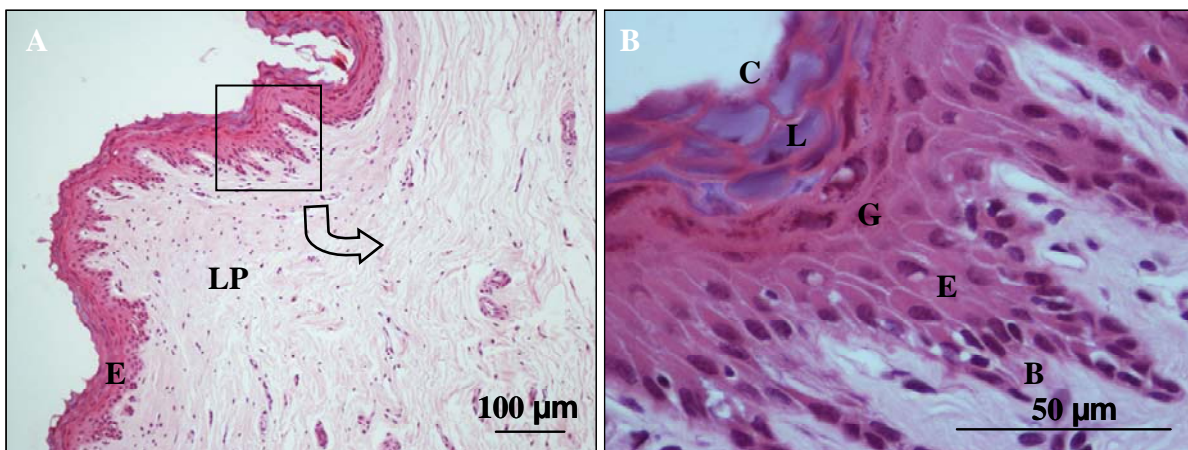


Figura 1.9.- Histología de la mucosa del rumen de oveja (A), en la que se muestran las diversas capas del epitelio estratificado plano (B). E: epitelio. LP: lámina propia. B: Estrato basal. E: Estrato espinoso. G: estrato granuloso. L: Estrato lúcido. C: Estrato córneo.

El epitelio del **abomaso** y del **intestino** es cilíndrico simple. El abomaso contiene glándulas gástricas de tipo tubular ramificadas, ubicadas bajo el epitelio y rodeadas por una delgada capa de tejido conjuntivo laxo correspondiente a la lámina propia. En la región antral, las glándulas están predominantemente formadas por células mucosas. El abomaso y el intestino poseen *muscularis mucosae*, mientras que el rumen carece de ella (Fig. 1.10).

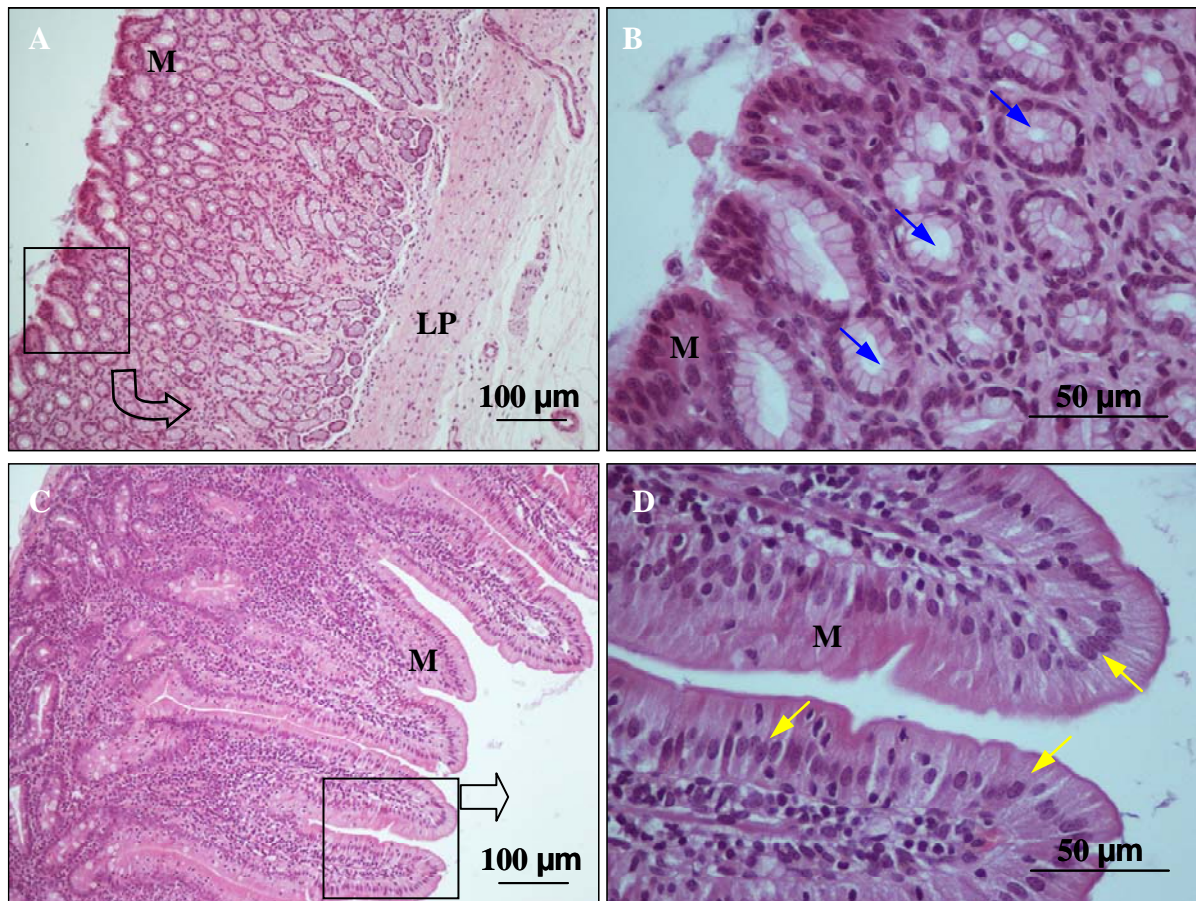


Figura 1.10.- Histología de la mucosa del antro abomasal (A y B) y duodeno de oveja (C y D). M: mucosa. LP: lámina propia. Flechas azules: glándulas gástricas. Flechas amarillas: enterocitos de las vellosidades intestinales.

### 1.3.1.2 SUBMUCOSA

La submucosa es una capa de tejido conjuntivo laxo, en la que suele haber numerosos linfocitos y vasos sanguíneos. En el caso del **rumen**, al no poseer *muscularis mucosae*, el tejido conjuntivo de la mucosa se continúa con el submucoso. Debajo de la membrana basal del epitelio ruminal existe una red de capilares fenestrados, mientras que en el interior de las papilas se extiende una condensación de fibras de tejido conjuntivo, que puede confundirse con la *muscularis mucosae*. La submucosa **abomasal** presenta una gran infiltración de tejido adiposo en numerosas ocasiones. Entre la capa submucosa y la muscular se sitúa el plexo submucoso o de Meissner (Fig. 1.11).

### 1.3.1.3 MUSCULAR

La capa muscular del tracto digestivo está formada por dos capas de fibras musculares lisas. La muscular interna, integrada por fibras musculares lisas dispuestas de manera circular y la muscular externa, constituida por fibras musculares lisas en disposición longitudinal. Entre ambas se sitúa el plexo nervioso mientérico o de Auerbach. Estas dos



capas musculares son las responsables de los fenómenos de motilidad del tubo digestivo (Fig. 1.11).

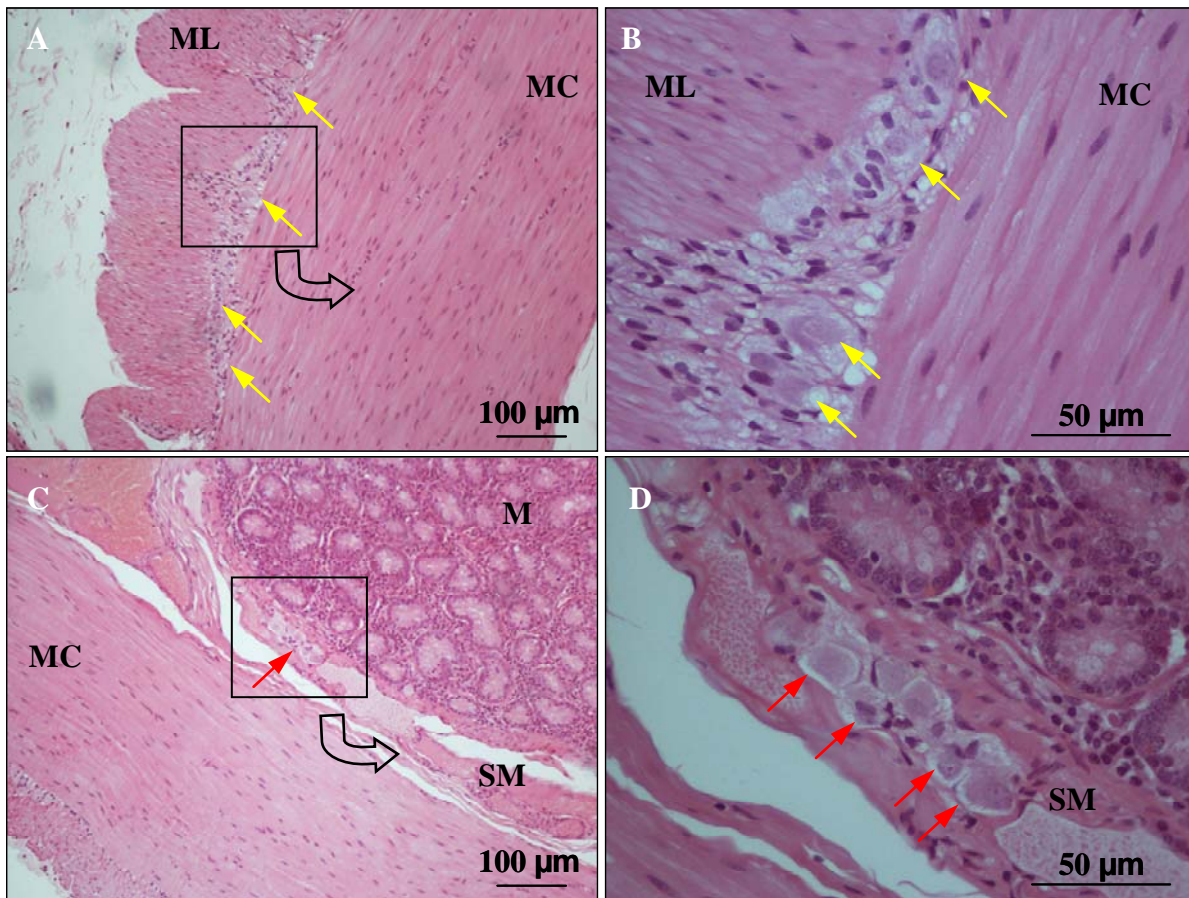


Figura 1.11.- Histología de los plexos nerviosos mientérico o de Auerbach (A y B) y submucoso o de Meissner (C y D) en cortes de duodeno de oveja. ML: muscular longitudinal. MC: muscular circular. M: mucosa. SM: submucosa. Flechas amarillas: neuronas del plexo mientérico. Flechas rojas: neuronas del plexo submucoso.

#### 1.3.1.4 SEROSA

La serosa es una capa relativamente fina equivalente al mesenterio, que rodea al aparato digestivo a cualquier nivel considerado.

### **1.3.2 HÍGADO**

El hígado es una gran glándula lobulada rodeada por una cápsula delgada de tejido conectivo (cápsula de Glisson) y un mesotelio. Cada lóbulo está dividido en numerosos lobulillos clásicos constituidos por unos espacios vasculares o sinusoides y por placas de células parenquimatosas, los hepatocitos, de morfología hexagonal. Estos últimos se organizan radialmente alrededor de una vena central. Las áreas donde se reúnen tres o más lobulillos se denominan espacios portales, cada uno de los cuales contiene una o más ramas de la vena porta y de la arteria hepática, y uno o más conductillos biliares y vasos linfáticos. Estos componentes están sostenidos por una trama de tejido conectivo. Los conductillos biliares se unen para formar el conducto biliar. El epitelio de los conductillos biliares es cúbico simple mientras que el del conducto biliar es cilíndrico simple. En los conductos mayores se observan células caliciformes. (Fig. 1.12).

Las hileras de hepatocitos delimitan unos espacios vasculares o sinusoides donde se localizan los macrófagos hepáticos o células de Kupffer. Estas células poseen uno o dos núcleos y emiten unas prolongaciones alargadas.

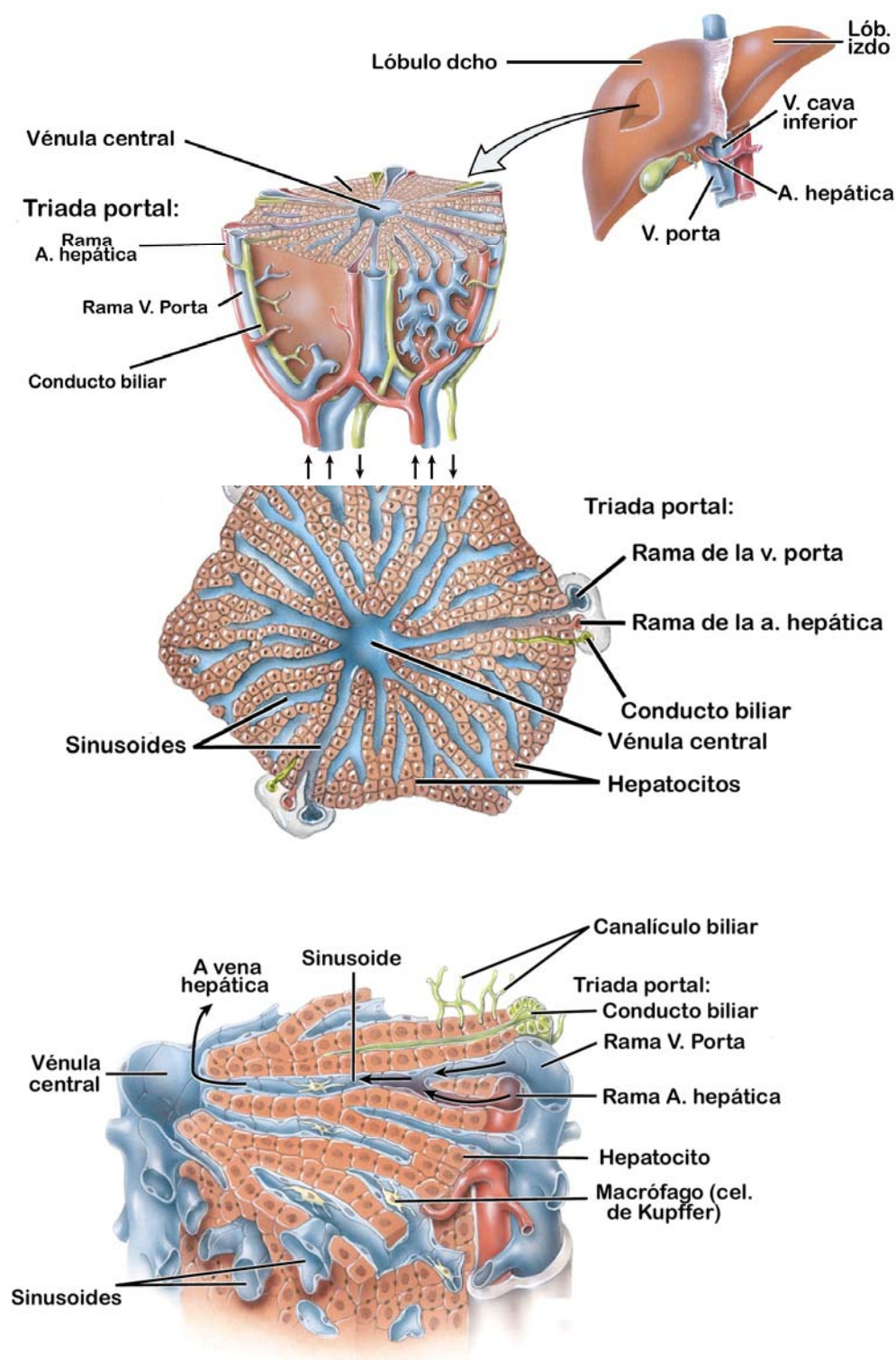


Figura 1.12.- Histología del hígado. Modificada de Principios de Anatomía y Fisiología, Tortora y Derrickson, 11/e. 2006.



### 1.3.3 PULMÓN

Los pulmones, cubiertos por la hoja visceral de la pleura, contienen una trama conectiva rica en fibras elásticas que sostienen al árbol bronquial y divide a los pulmones en lóbulos y lobulillos. Los bronquios están revestidos por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células caliciformes. La lámina propia está rodeada por una capa de músculo liso cuyas fibras se orientan en sentido oblicuo. El tejido conectivo que rodea la muscular presenta glándulas mixtas y placas de cartílago hialino. Los bronquios más pequeños dan origen a los bronquiolos, que carecen de cartílago y glándulas. Estos últimos, a su vez, originan sucesivamente los conductos y sacos alveolares, cuyas paredes delgadas están constituidas por alvéolos. Cada conducto alveolar se ramifica para originar tres o más sacos alveolares. Los alvéolos están revestidos por células epiteliales extremadamente planas (neumocitos tipo I). Los alvéolos están separados entre sí por una delgada capa de delicadas fibras colágenas y elásticas muy vascularizada. Esta capa, junto con el revestimiento epitelial de los alvéolos adyacentes, forman el septo o tabique interalveolar (Fig. 1.13).

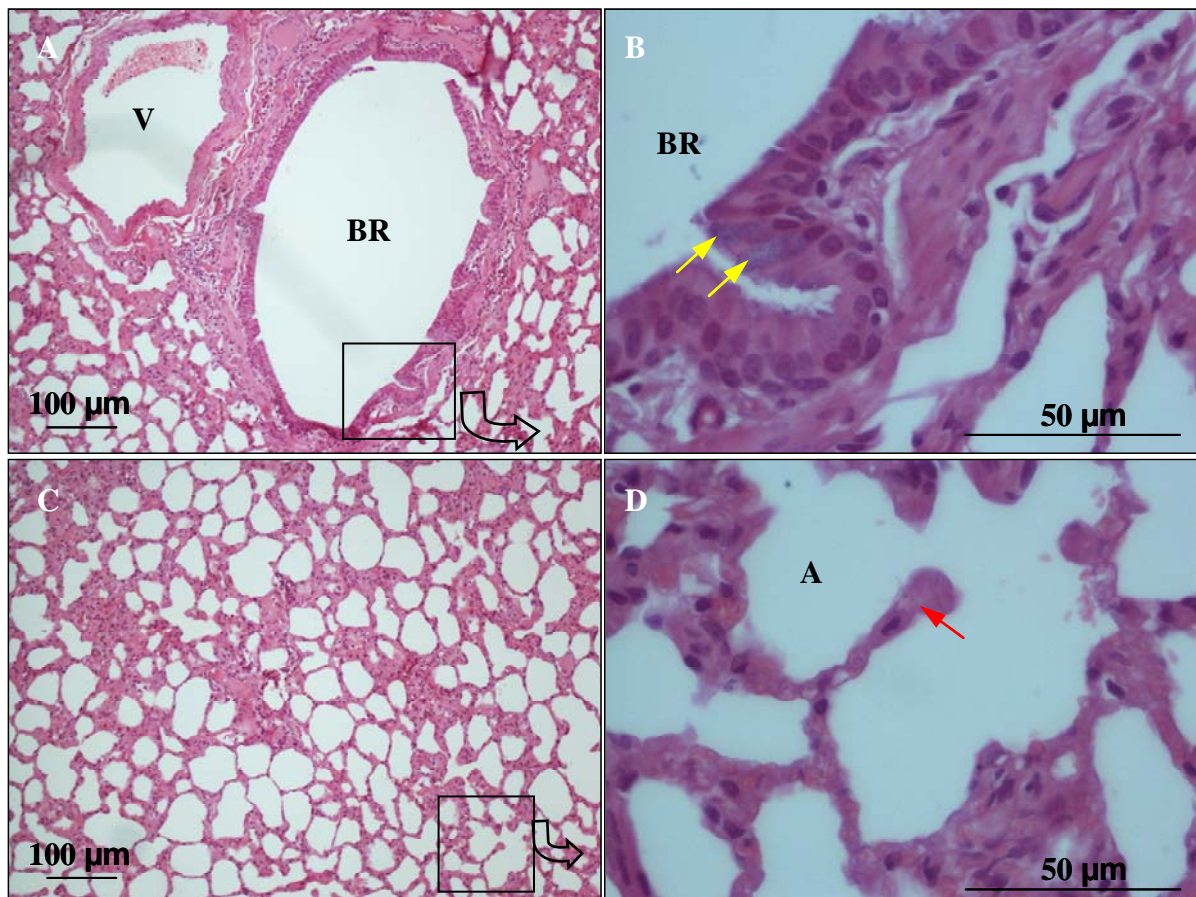


Figura 1.13.- Histología del pulmón de oveja A y B: Bronquiolo respiratorio (BR) revestido por células cilíndricas ciliadas, entre las cuales puede observarse la presencia de células caliciformes (flechas amarillas). Además se observa el corte transversal de un vaso sanguíneo (V) cuya pared posee fibras musculares lisas. C y D: Los bronquiolos se ramifican dando lugar a los conductos alveolares y alvéolos (A), los cuales están separados entre sí por una delgada capa de fibras colágenas y elásticas (flechas rojas).

### 1.3.4 HIPOTÁLAMO Y BULBO RAQUÍDEO

El sistema nervioso está constituido por neuronas de varias clases y tamaños y por sus elementos de sostén. Este sostén lo proporcionan por las células de la glía (astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células ependimales) y sus procesos, que se disponen constituyendo una trama compleja. Sus funciones incluyen la formación de mielina, asegurar un ambiente iónico adecuado, la recaptación de los neurotransmisores o una función de defensa (Fig. 1.14).

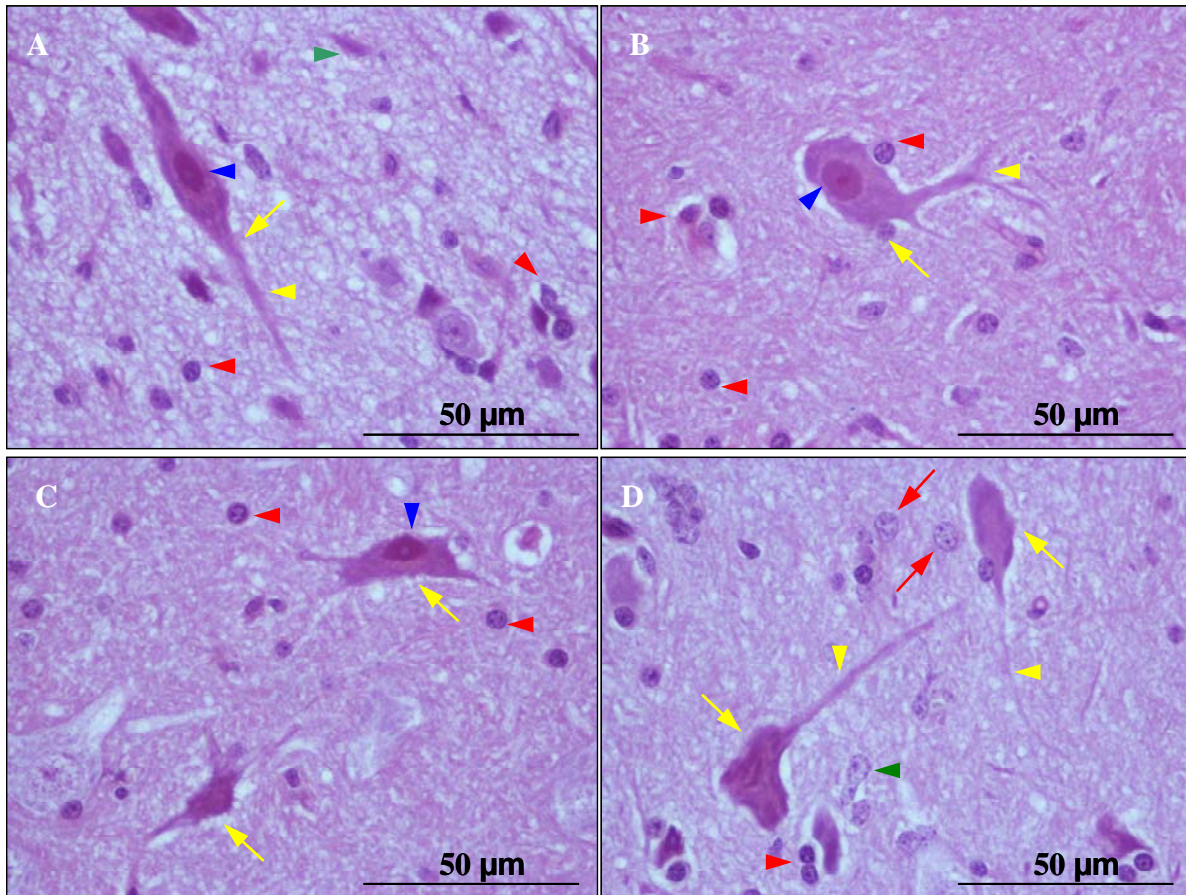


Figura 1.14.- Histología del hipotálamo de oveja. Neuronas (flechas amarillas en A-D) de las que se distingue su axón (puntas de flechas amarillas en A, B y D) y núcleo (punta de flecha azul en A, B y C), en cuyo interior se intuye el denominado Cuerpo de Barr (B). También se observan células de la glía, concretamente oligodendrocitos (puntas de flechas rojas en A-D), astrocitos (flechas rojas en D) y microglía (puntas de flechas verdes en A y D).



## 1.4 MOTILIDAD DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

La motilidad intestinal tiene varias funciones: mezcla el alimento con las secreciones pancreáticas, biliares e intestinales, transporta el contenido intestinal a la velocidad adecuada para que se produzca una eficaz digestión de glúcidos, lípidos y proteínas, facilita una exposición máxima de los nutrientes digeridos a la mucosa del intestino delgado para permitir su absorción, y por último, elimina los restos de los alimentos y secreciones que quedan en la luz intestinal tras el paso del alimento. La motilidad es posible gracias a las contracciones de la musculatura circular y longitudinal del tracto GI.

### 1.4.1 ESTRUCTURA DE LA CÉLULA MUSCULAR LISA GASTROINTESTINAL

En el sarcoplasma de la célula muscular lisa podemos distinguir dos dominios estructurales: un dominio contráctil y otro citoesquelético (Small y cols., 1986). El dominio contráctil contiene miofilamentos gruesos formados por miosina y filamentos finos formados por actina y tropomiosina. El citoesquelético posee  $\alpha$ -actinina (formando parte de los cuerpos densos), desmina, filamina, laminina, gelsolina, vimentina y el isómero citoplasmático de  $\beta$ -actina (Stromer, 1995).

La molécula de miosina representa el motor molecular de las células musculares lisas de los vertebrados. Las dos propiedades biológicas más destacadas de esta molécula son su capacidad para convertir la energía química del ATP en trabajo mecánico, y la posibilidad de organizarse en filamentos en los que todas las cabezas de miosina presentan la misma polaridad a lo largo de un borde, y la polaridad opuesta en el otro borde del filamento. Además existen zonas descubiertas (sin cabezas) en uno de los extremos de cada borde del filamento (Craig y Megerman, 1977).

Constituye los filamentos gruesos y, como muestra la Fig. 1.15, esta molécula está formada por dos cadenas pesadas (HCs) de aproximadamente 220 kDa cada una y dos pares de cadenas ligeras (LCs) localizadas en la región del cuello de la cabeza globular de la miosina (Sellers y cols., 1988). Las HCs conforman un filamento rígido (alfa-hélice) y dos cabezas ligeramente elongadas de estructura globular. Cada cabeza presenta su dominio motor en dos regiones conocidas como porción S-1 (Sellers y Harvey, 1984). Cada porción globular tiene dos tipos de LC, una cadena ligera reguladora (MLC20) y una cadena ligera esencial (MLC17) (Flicker y cols., 1983).

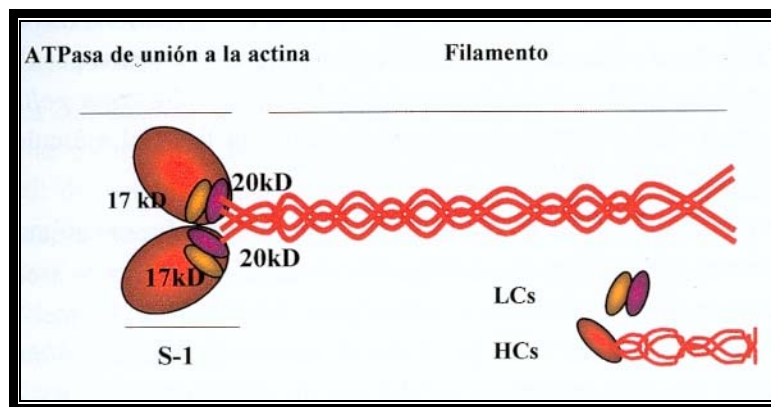


Figura 1.15.- Molécula de miosina del músculo liso (Aldstein y Sellers, 1996). Tomada de Alcón, 2000.

La actina en el músculo liso desempeña un papel fundamental, por formar parte del aparato contráctil, así como del citoesqueleto. Puede existir bajo dos formas: la actina-G monomérica (globular) y la actina-F polimérica (filamentosa). Esta última es la que constituye los filamentos finos (Ikebe y cols., 1987).

En el músculo liso también adquieren gran importancia las proteínas receptoras de  $\text{Ca}^{2+}$ . Destaca entre ellas la calmodulina, ubicua y multifuncional, que interviene en el proceso contráctil. La calmodulina posee 4 sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y cuando se produce dicha unión desarrolla una configuración funcional que le permite reconocer gran variedad de proteínas tales como fosfodiesterasas, proteínas cinasas, bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  y proteínas de motilidad.

#### 1.4.2 MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN Y RELAJACIÓN DE LA CÉLULA MUSCULAR LISA

El mecanismo básico para la generación de fuerza es el mismo en todos los tipos de músculo de los vertebrados: la interacción cíclica entre la actina y la miosina y, consecuentemente, el deslizamiento de los filamentos finos sobre los gruesos (Taylor, 1987) e implica la fosforilación del puente cruzado en el residuo de serina específico (Ser 19) de la MLC20. Este mecanismo emplea ATP como donante de fosfato.

Las uniones entre la actina y la miosina tienen dos conformaciones: la llamada conformación “débil”, en la que la afinidad de unión es baja, producida en presencia de ATP y la conformación “fuerte”, con afinidad de unión elevada y que aparece cuando la molécula de miosina pierde el  $\text{Pi}$  procedente de la hidrólisis de ATP (Sweeney y cols., 1994).

Cuando en el músculo liso se incrementa la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, éste se une a la calmodulina, la cual sufre un cambio conformacional que expone los lugares de interacción con la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK). Así se constituye el

complejo ternario  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina-MLCK que transfiere el fosfato del ATP a la MLC20. Esta fosforilación resulta esencial para la activación de la actividad ATPásica de la cabeza de la miosina. La consiguiente pérdida de  $\text{P}_i$  por la cabeza de la miosina, como se ha comentado anteriormente, genera la transición de la conformación “débil” a la “fuerte”, dando lugar a otro cambio en la conformación de la zona del cuello de la cabeza de la miosina. Así se produce el denominado “golpe de fuerza”, responsable del deslizamiento del filamento de actina sobre el de miosina, lo cual constituye el proceso de contracción propiamente dicho (Ikebe y cols., 1987). La liberación del ADP es rápida y tras ella el sitio de unión para otra molécula de ATP queda libre y la unión de ésta provoca de nuevo la conformación “débil” y el inicio de un nuevo ciclo (Somlyo y Somlyo, 1994).

Al disminuir la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y la recaptación hacia los depósitos intracelulares), la cinasa se inactiva y se produce la defosforilación de la cadena ligera impidiendo que se formen los enlaces cruzados, lo que lleva a la relajación de la fibra muscular.

### **1.4.3 ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL MÚSCULO LISO GASTROINTESTINAL: LAS ONDAS LENTAS**

Las células musculares lisas del tracto GI mantienen una diferencia de potencial eléctrico a ambos lados de la membrana (potencial de membrana), siendo negativo el interior respecto al exterior (entre -70 y -60 mV). Esta diferencia de potencial fluctúa espontáneamente, constituyendo las ondas lentas o ritmo eléctrico de base.

Se trata de despolarizaciones lentas, espontáneas y transitorias, registrándose desde la parte media del cuerpo gástrico hasta el colon. Estas ondas son generadas en las células intersticiales de Cajal (ICCs) (Huizinga y cols., 1995). La despolarización de las ICCs se transmite a las células musculares, para posteriormente propagarse de una célula muscular a otra a través de las uniones en hendidura. Cuando la despolarización de la onda lenta supera el umbral de descarga, se producen potenciales de acción sobre las crestas de las ondas lentas, debidos a la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y al paso de éste al citosol desde el exterior de la célula (Horowitz y cols., 1999). Sobre una onda lenta se pueden producir varios de esos potenciales de acción, constituyendo la salva de potencial, de manera que la contracción será proporcional al número de potenciales de acción generados sobre dicha onda lenta. Como sólo pueden ocurrir salvas de potencial sobre las ondas lentas, la frecuencia de éstas determinará la máxima frecuencia de las contracciones.

Esta actividad eléctrica y la contracción asociada se transmite de unas células a otras, de manera que se produce la contracción coordinada de un área localizada del órgano. Por ello, la función de las ondas lentas sería la de sincronizar las contracciones del músculo GI,

para conseguir que esta motilidad tenga la máxima eficacia. Normalmente, las ondas lentas se propagan en sentido aboral durante unos pocos centímetros con una velocidad de propagación de aproximadamente 1 cm/seg y por ello la contracción también viaja en ese sentido.

La amplitud de las ondas lentas y en menor medida su frecuencia están controladas por los sistemas nervioso (extrínseco e intrínseco) y endocrino. En general, la estimulación parasimpática aumenta la amplitud y la estimulación simpática la disminuye o la suprime. Los neurotransmisores y hormonas que aumentan la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula muscular aumentarán la despolarización de la onda lenta, facilitando la producción de potenciales de acción y sus contracciones asociadas. Por el contrario, los agentes inhibidores que aumentan la permeabilidad al  $\text{K}^{+}$ , hiperpolarizarán la célula haciendo más difícil que se generen los potenciales de acción.

#### **1.4.4 EL COMPLEJO MOTOR (O MIOELÉCTRICO) MIGRATORIO (MMC)**

El **MMC** es el patrón cíclico básico de la motilidad GI que se observa en el estómago e intestino delgado de mamíferos y que se caracteriza por la aparición de un grupo de contracciones regulares que migra lentamente desde el estómago hasta la parte distal del intestino delgado.

En 1902, Boldyreff describió en el perro periodos de actividad motora gástrica que alternaban con periodos de quiescencia. La ingesta de alimento interrumpía este patrón de actividad motora, pero cuando el estómago estaba vacío el periodo rítmico se reestablecía.

A finales de los años sesenta, dos grupos de investigación hicieron grandes avances en el campo de la electromiografía, técnica clave para el estudio del MMC: Ruckebusch y Laplace en Francia y Code y Szurszewski en EEUU. Ruckebusch y Laplace en 1967 utilizando técnicas de electromiografía, identificaron en el intestino de la oveja unos ciclos de aumento de actividad que se producían aproximadamente 16 veces al día. Además, se demostró que existía una buena correlación entre las salvas de potencial y las contracciones de la musculatura GI, por lo que la representación de la actividad mioeléctrica era directamente proporcional a la amplitud de la contracción (Ruckebusch, 1970). Gracias a este descubrimiento se utiliza actualmente la electromiografía como estimación de la motilidad GI.

Code y Szurszewski, utilizando también técnicas de electromiografía, describieron en el perro por primera vez el carácter continuo e ininterrumpido del MMC. Al mismo tiempo demostraron que el MMC migraba a lo largo de todo el intestino delgado, de manera que cuando un frente de actividad alcanzaba el íleon, otro nuevo se estaba iniciando ya en el

duodeno (Szurszewski, 1969, Code y Marlett, 1975). Basándose en estos estudios dividieron la actividad intestinal en tres periodos consecutivos:

- **Fase I** (fase de quiescencia): no se produce ninguna salva de potencial sobre las ondas lentas y por tanto no hay contracciones.
- **Fase II** (fase de actividad irregular): algunas ondas lentas presentan salvas de potencial y otras no, de manera que se producen contracciones pero de forma aislada y se propagan poco.
- **Fase III** (fase de actividad regular): todas las ondas lentas llevan asociadas salvas de potencial. Consiste en un grupo de contracciones peristálticas que se propagan aboralmente. La fase III puede terminar de forma brusca o bien ir seguida de un periodo corto de contracciones intermitentes que algunos autores denominan fase IV y que da paso a la fase I.

La fase de quiescencia del MMC permite que el músculo descanse y se regenere. Sus fases activas aseguran el ejercicio físico del músculo liso.

Dependiendo de la especie animal, los MMCs pueden iniciarse en el estómago o en el intestino. En el hombre, perro, hurón y zarigüeya la actividad motora del estómago presenta cambios cíclicos que van asociados a los MMCs intestinales. La fase III gástrica comienza antes que la duodenal pero ambas terminan al mismo tiempo. Por otra parte en animales como la rata, el cerdo, el cobaya y la oveja, la fase III comienza en el duodeno, mientras que en el conejo empieza en el yeyuno. Además, en cerdo, cobaya y oveja las contracciones gástricas se inhiben coincidiendo con la fase III duodenal, mientras que en rata y conejo la motilidad gástrica no fluctúa con el MMC.

La duración de los MMCs depende de la especie animal aunque por término medio varía entre 60 y 120 minutos (Buéno y Ruckebusch, 1978a), excepto en la rata en la que se repiten cada 15-20 min (Ruckebusch y Fioramonti, 1975).

Existen diferencias considerables entre las distintas especies según se trate del periodo postprandial o del interdigestivo (Fig. 1.16). En la mayoría de las especies monogástricas la ingesta de alimentos interrumpe los MMCs y aparece en su lugar una actividad motora continua de tipo irregular muy similar a una fase II. Por ello, en estas especies los MMCs sólo se observan en los periodos interdigestivos (Romanski, 2009a). La duración de esta interrupción depende de la especie, de la cantidad de alimento y de las propiedades físicas y químicas del mismo. Cuando los MMCs reaparecen tras una comida, generalmente lo hacen a nivel del yeyuno o del íleon y los ciclos posteriores comienzan ya normalmente en el duodeno o estómago. En estas especies el mayor flujo de contenido del intestino delgado se produce durante la interrupción postprandial de la actividad cíclica. La función de los

MMCs podría ser la de limpiar el tracto GI de los residuos de alimento, secreciones y descamaciones celulares, propulsando estos contenidos digestivos residuales hacia el colon y evitando así el crecimiento de bacterias (Wingate, 1981, Buéno y Ruckebusch, 1978a).

Sin embargo en el cerdo con alimentación *ad libitum* no se interrumpen los MMCs e incluso tras una comida única y copiosa, la interrupción es transitoria. En el otro extremo se encuentran los rumiantes, conejos y cobayas en los cuales estos ciclos de actividad no se interrumpen nunca, debido a que siempre tienen contenido digestivo en el estómago (independientemente de cuándo se realice la comida) y por eso se produce un vaciamiento gástrico ininterrumpido durante todo el día. En estas especies los MMCs juegan un importante papel en el transporte de la digesta a lo largo del tracto GI (Sarna, 1985, Buéno y Ruckebusch, 1978a). Concretamente, en la oveja, el contenido intestinal fluye intermitentemente en periodos de 10-15 min, con la misma frecuencia que los MMCs. Dos tercios de este flujo ocurre 4-6 min inmediatamente antes de la fase III y por tanto la velocidad media de propagación del alimento es idéntica a la de la fase III (Buéno y cols., 1975).

El gato parece ser una excepción entre los mamíferos, ya que durante los periodos interdigestivos, el intestino felino presenta patrones cíclicos diferentes, llamados complejos migratorios en espiga (De Vos, 1993). En las aves domésticas se ha demostrado que los MMCs se inician en yeyuno e íleon y poseen un patrón electromiográfico idéntico al de los mamíferos (Mueller y cols., 1990).

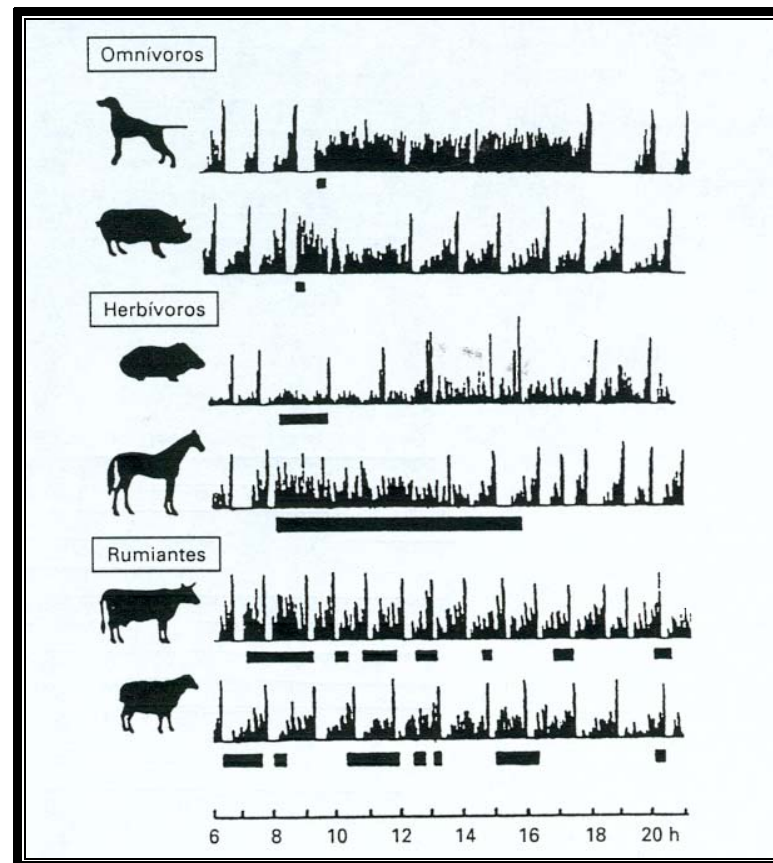


Figura 1.16.- Perfil motor del duodeno tras la ingesta de alimento. La comida se administraba una vez al día y se dejaba *ad libitum*. Los trazos negros horizontales indican los periodos en los que el animal ingiere alimento. Tomada de Ruckebusch y cols., 1981.

#### 1.4.5 CARACTERÍSTICAS DE LA ACTIVIDAD MOTORA GASTROINTESTINAL EN LA OVEJA

En cuanto a los preestómagos, en el retículo-rumen se producen dos ciclos de contracciones: las primarias o de mezcla y las secundarias o eructativas.

El ciclo primario se produce con una frecuencia aproximada de uno por minuto. Se inicia con una contracción bifásica del retículo que se propaga al rumen, comenzando por el saco craneal. A continuación se contraen secuencialmente los sacos dorsal y ciego dorsal y, seguidamente, el saco ventral y el ciego ventral. Este ciclo sirve para la mezcla de la ingesta y permite su paso a las siguientes estructuras. Así, cuando se ingiere alimento, las partículas parcialmente trituradas llegan al retículo. Durante la primera fase de la contracción reticular, el bolo pasa al saco dorsal. La contracción de éste y del ciego dorsal permite que parte de su contenido pase al saco ventral. Con las contracciones del saco ventral, los materiales más densos con menor tamaño de partícula caen al fondo del saco craneal, y de allí, por contracción del mismo a la parte inferior del retículo, abandonando esta estructura con la

segunda fase de la contracción reticular, de forma simultánea con la apertura del orificio retículo omasal. Así los contenidos pasan hacia el omaso y desde allí al abomaso.

Las contracciones secundarias se producen tras el ciclo primario, pero no en todos los casos, sino preferentemente cuando los niveles de gases producidos por las fermentaciones son importantes. Constan de una contracción del saco dorsal seguida de la del saco ventral, ambas con propagación caudo-cefálica. Así el gas se desplaza hacia el cardias y puede ser eliminado por el eructo, evitándose la distensión del rumen.

Precisamente debido a la existencia de los preestómagos, en los rumiantes el flujo de ingesta desde el retículo-rumen hacia el abomaso es ininterrumpido y los movimientos del abomaso, coordinados con los del bulbo duodenal, son imprescindibles para que se produzca de manera casi continuada el vaciado gástrico. La parte con mayor actividad motora del abomaso es la zona antral. En la oveja, casi todas las contracciones se producen en la zona antral próxima al píloro, a intervalos de 50-70 segundos y se propagan hacia el bulbo duodenal provocando la salida de un bolo de quimo. Sin embargo se producen entre 15 y 18 periodos de inactividad antral cada 24 horas, con una duración media de 5-10 minutos cada uno, coincidiendo con la aparición de una fase III en el duodeno, que dura una media de 3-4 minutos (Ruckebusch y Pairet, 1984). El flujo de digesta a través del píloro se produce de forma asociada a las contracciones del antro y del duodeno (fase II) y se interrumpe con la aparición de la fase III duodenal, que coincide como hemos indicado con el periodo de inactividad antral.

El esfínter pilórico también está coordinado con la actividad motora del abomaso y el duodeno. En el píloro se observan contracciones periódicas seguidas de relajaciones (4-6/min) durante el periodo de actividad del antro abomasal. Sin embargo, durante el periodo de quiescencia antral y la fase III duodenal se produce una contracción permanente del esfínter pilórico, con la finalidad de evitar el reflujo del contenido digestivo y conseguir una mayor eficacia en la propulsión de éste.

Como ya hemos descrito con anterioridad, en los rumiantes el patrón motor GI no se ve interrumpido por la ingestión de alimento, probablemente debido a que los preestómagos siempre tienen contenido en su interior y el vaciamiento gástrico se produce de forma casi continua. Los complejos mioeléctricos migratorios de la oveja se inician en el bulbo duodenal y se producen con una frecuencia media de uno cada 103 minutos (Plaza y cols., 1997a).



### 1.4.6 REGULACIÓN DE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL

La motilidad GI está bajo un control neuro-hormonal.

La actividad motora cíclica de los preestómagos se regula gracias al sistema nervioso extrínseco, a modo de un reflejo vago-vagal, controlado por los centros gástricos del bulbo raquídeo. No obstante, se ha observado que en ausencia de innervación vagal y esplácnica, el músculo liso de las paredes del retículo-rumen es capaz de desarrollar contracciones de baja amplitud, denominadas contracciones intrínsecas, que pueden atribuirse a la contractilidad de las propias células musculares (contracciones miogénicas) o bien requerir la participación de las neuronas del sistema nervioso entérico (SNE) (contracciones neurogénicas).

La regulación de la motilidad antroduodenal y del flujo de ingesta a través del píloro es compleja. Existe un control inhibitorio de dicho flujo, ejercido por reflejos enterogástricos que se originan en el bulbo duodenal. De esta forma, las señales aferentes captadas por receptores de distensión y químicos, son transmitidas por fibras vagales aferentes provocando respuestas organizadas que inhiben el vaciado del abomaso.

En cuanto a la regulación de los MMCs, se han postulado tres mecanismos principales: el sistema nervioso extrínseco, el sistema nervioso intrínseco o entérico (SNE) y un control hormonal (Romanski, 2009).

La aparición de la fase III, tanto de origen gástrico como intestinal, se debe a la estimulación colinérgica cíclica que implica sinapsis nicotínicas, ya que en ambos casos, las fases III son abolidas por atropina y hexametonio (Buéno y Ruckebusch, 1978b). Los MMCs gástricos están modulados por la innervación extrínseca, en particular por el nervio vago. Sin embargo, los de origen intestinal son independientes de la innervación extrínseca, ya que se ha demostrado que no son abolidos tras realizar una vagotomía, a diferencia de lo que ocurre en el estómago (Takakuwa, 1982). Así, el SNE es el responsable de la iniciación y la migración de la fase III intestinal, mientras que el sistema nervioso central (SNC) participa en la regulación de la frecuencia del MMC y en la duración de sus fases (Chung y cols., 1994).

En cuanto al control hormonal del MMC, la **motilina** es la hormona más importante implicada en el inicio de los MMCs gástricos en el perro y en el hombre, y su administración exógena puede inducir contracciones de fase III (Tack y Peeters, 2001). Los niveles plasmáticos de motilina fluctúan durante el periodo interdigestivo, observándose los mayores niveles en el inicio de la fase III en el duodeno, mientras que los más bajos se daban durante la fase I duodenal (Lee y cols., 1978). Al igual que la motilina, la administración exógena de **grelina** induce contracciones de fase III de origen gástrico en el hombre (Tack y cols., 2006), rata (Fujino, 2003) y ratón (Zheng y cols., 2009), no estando acompañadas por un pico de motilina sugiriendo que la grelina tiene un efecto directo sobre

el MMC. Se ha establecido que la motilina regula las contracciones gástricas de fase III en el perro y en el hombre, mientras que la grelina regula las contracciones gástricas de fase III en rata y ratón.

El **polipéptido pancreático** (PP) presenta variaciones plasmáticas de forma sincronizada a las de la motilina tanto en perro (Keane y cols., 1980) como en el hombre (Janssens y cols., 1982).

La **somatostatina** se ha propuesto como un inhibidor de los MMCs gástricos en el perro (Poitras y cols., 1980, Aizawa y cols., 1981). Esta hormona actuaría como regulador de los MMCs de origen intestinal, ya que la administración de somatostatina aumenta la frecuencia de los MMCs yeyunales (Poitras y cols., 1980). En la oveja, la somatostatina induce una fase III duodenal (Plaza y cols., 1996b) y sus tasas plasmáticas fluctúan con el MMC, con un pico en la fase I (Plaza y cols., 1996a), por lo que podría estar implicada en la regulación de los MMCs intestinales.

La **5-HT**, actuando sobre receptores 5-HT<sub>3</sub> juega, asimismo, un papel importante en el inicio de los MMCs gástricos, tanto en perros como en humanos (Nagakura y cols., 1997). Se ha sugerido que la motilina podría iniciar la fase III gástrica en el perro a través de la activación de las neuronas serotoninérgicas del plexo mientérico, y que la 5-HT liberada actuaría posteriormente sobre los receptores 5-HT<sub>3</sub> para activar las vías colinérgicas que producen contracciones gástricas (Haga y cols., 1996; Takahashi, 2012).

También se ha descrito el papel regulador fisiológico de algunos neuropéptidos que actúan en el SNC. Entre ellos cabe destacar que la administración iv de **colecistoquinina** (CCK) interrumpe los MMC en el intestino delgado del perro (Mukhopadhyay y cols., 1977).

Otro péptido que participa en la regulación de los MMCs es la **gastrina**. En el perro (Hall y cols., 1983) y en el hombre (Peeters y cols., 1980) se ha observado un aumento de sus concentraciones plasmáticas asociado con la fase II duodenal. Además, su administración por vía endovenosa interrumpe el patrón motor del periodo interdigestivo.

De manera similar, la **neurotensina** administrada por vía endovenosa en perros y en el hombre, es capaz de provocar un patrón motor intestinal muy similar al observado tras la ingesta de alimento. Sin embargo, la concentración de neurotensina necesaria para interrumpir los MMCs se aleja mucho de las concentraciones plasmáticas fisiológicas observadas en periodo postprandial en el hombre (Shaw y Buchanan, 1983). En ratas, la concentración plasmática de esta hormona sufre cambios circadianos, con un pico máximo durante la noche, que se corresponde con el periodo de máxima ingesta y con la interrupción de los MMCs (Ferris y cols., 1986). Estos datos sugieren que la neurotensina por vía

periférica participa en la interrupción postprandial de los MMCs. Sin embargo, este péptido restaura los MMCs en el yeyuno cuando se administra por vía icv en situación postprandial en ratas, por lo que se ha postulado que la neurotensina a nivel central regularía la reaparición de los MMCs tras la ingesta (Buéno y cols., 1985).

#### **1.4.7 EL SISTEMA INMUNITARIO COMO REGULADOR DE LA ACTIVIDAD GASTROINTESTINAL**

El revestimiento epitelial del tracto GI de los mamíferos está continuamente expuesto al medio externo, por lo que además del alimento, pueden acceder a él microorganismos y diversos agentes patógenos. Por lo tanto, el sistema inmune intestinal será de gran importancia para la neutralización y eliminación de agentes extraños al organismo. Está integrado por agregados linfoides (linfocitos B, inmunoglobulinas A (IgA) y células T), una población difusa de células inmunes de la lámina propia (linfocitos B, macrófagos, eosinófilos y mastocitos) y linfocitos intraepiteliales (células T) (Stead y cols., 1987). Por otra parte, otros procesos del tracto digestivo además de los inmunológicos contribuyen a la defensa del hospedador: secreción ácida gástrica, secreción de moco, agua y electrolitos o los movimientos peristálticos.

La respuesta intestinal frente a los antígenos y agentes patológicos, requiere la actuación de un sistema neuro-inmunológico integrado. Así, se ha observado la presencia de contactos entre las membranas de las varicosidades de los axones y las membranas de distintas células del sistema inmune. También se han identificado receptores específicos de neurotransmisores como la sustancia P (SP), somatostatina y polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) en diversas células inmunológicas. Por otra parte, se ha descrito que bajo diversas condiciones patológicas como en casos de parasitismo o durante la fase aguda de la inflamación, se puede producir el crecimiento de determinados nervios, por efecto del factor de crecimiento neural (NGF), y que este factor también afecta a la población de células inmunes y es capaz de inducir una hiperplasia de mastocitos así como una degranulación de los mismos.

Además de regular localmente las funciones GI, el control neuro-inmunológico también se puede ejercer en lugares extra-intestinales, sobre todo en el sistema nervioso. Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, las secreciones GI así como los procesos motores están regulados por el SNC. Por otra parte, los agentes infecciosos son capaces de inducir la liberación de citocinas, particularmente de interleucina-1 (IL-1), en los astrocitos del cerebro y en las células de la microglía, que ejercen un importante papel en la inducción de fiebre y en las modificaciones de las funciones GI. Además, las fibras viscerales aferentes pueden actuar como vía de comunicación entre el SNC y la respuesta inmune. Concretamente el nervio vago supone una importante vía moduladora, participando

en el establecimiento de la estrecha y compleja relación entre el tracto GI, el sistema inmunitario y el SNC.

La mucosa GI posee gran cantidad de **mastocitos**. Estudios histológicos demuestran que existe una asociación íntima entre los mastocitos y las neuronas tanto del SNC como del periférico (Dimitriadou y cols., 1990). Por lo que estas células podrían funcionar como transportadores bidireccionales de información entre el sistema nervioso y el inmunológico. La degranulación de los mastocitos puede producirse por la acción directa del NGF sobre los receptores localizados en los mastocitos y/o por un mecanismo indirecto a través de la liberación de SP desde los nervios intrínsecos o extrínsecos (Dray y Bevan, 1993). Tras la degranulación, se expulsan al medio una serie de mediadores como 5-HT, histamina, eicosanoides y citocinas, que pueden modular la fisiología digestiva.

Los neurotransmisores también pueden desencadenar respuestas inmunitarias actuando sobre receptores de neuropéptidos localizados en otras células del sistema inmune, como son las células T, células B y los macrófagos. Esto sugiere que las señales nerviosas locales en los folículos linfoides y en la lámina propia regulan también diferentes aspectos de la respuesta inmune, que pueden alterar las funciones intestinales.

En muchos procesos inflamatorios provocados experimentalmente se ha observado una importante infiltración de **macrófagos** debido a su capacidad para fagocitar sustancias extrañas al organismo, además de ser una importante fuente de mediadores de la inflamación y citocinas, en particular de IL-1. Además, pueden producir óxido nítrico (NO) cuando se encuentran expuestos al LPS o a las distintas citocinas. El NO a altas concentraciones posee propiedades citotóxicas y/o citostáticas que son muy importantes para la eliminación de los microorganismos, pero al mismo tiempo puede producir daños en las propias células intestinales.

Los **granulocitos** (basófilos, neutrófilos y eosinófilos) están también implicados en la modificación de las funciones intestinales asociadas a procesos infecciosos o inflamatorios. Estos leucocitos se activan, entre otros factores, por endotoxinas bacterianas (LPS) y liberan al medio potentes reactivos oxidantes, proteasas y metabolitos del ácido araquidónico. Además son capaces de sintetizar y de reaccionar con diversas citocinas.

## 1.5 EL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) Y LAS CITOCINAS

### 1.5.1 LA PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

La pared celular de las bacterias Gram negativas es mucho más compleja que la de las Gram positivas (Fig. 1.17). Consta de tres zonas bien diferenciadas: membrana plasmática interna, espacio periplásmico (en donde se encuentra el péptidoglucano) y membrana

externa (Le Brun y cols., 2013). La membrana interna está constituida por una bicapa de fosfolípidos y regula el transporte de materiales.

La proteína de membrana más abundante en la membrana externa de las bacterias Gram negativas es la lipoproteína de Braun o lipoproteína de mureína, la cual sirve de unión entre el péptidoglucano y la membrana externa. Sin embargo los constituyentes más característicos de la membrana externa son los lipopolisacáridos (LPS) que sustituyen a los fosfolípidos, que predominan en la membrana interna. La membrana externa es relativamente permeable a pequeñas moléculas hidrofílicas, si la comparamos con la membrana citoplasmática. Esto es debido a la presencia de unas proteínas denominadas porinas, que se agrupan en trímeros formando unos canales que atraviesan la membrana externa. Algunas porinas son inespecíficas y forman canales rellenos de agua, a través de los cuales se produce el transporte de sustancias pequeñas. Otras porinas son muy específicas ya que sólo poseen un sitio de unión para una o más sustancias.

Sin embargo, dicha membrana externa no es permeable a enzimas o a otras moléculas de gran tamaño. Una de las principales funciones de esta membrana externa es la de retener algunas enzimas que se encuentran en el espacio periplásmico, evitando su salida al medio externo. En el periplasma o espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas podemos encontrar además del péptidoglucano, enzimas hidrolíticas, proteínas de unión y quimiorreceptores.

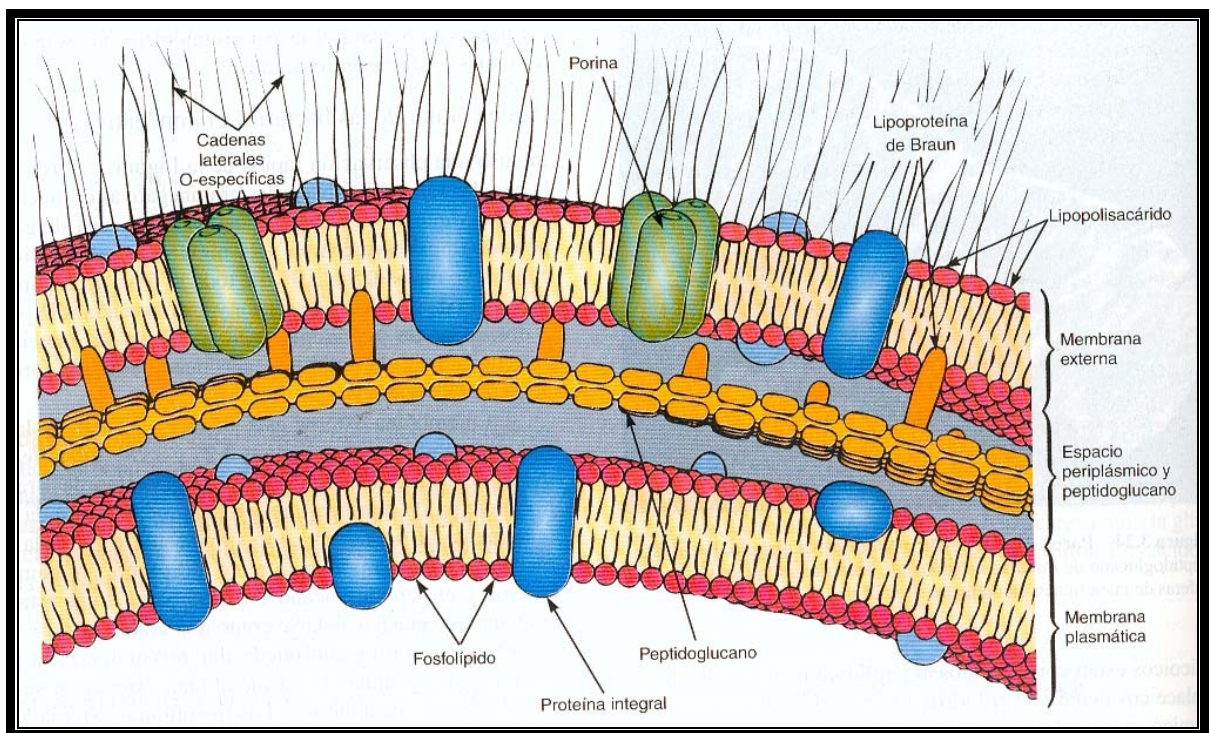


Figura 1.17.- Envoltura de una bacteria Gram negativa. Tomada de Prescott y cols., 1999.

### 1.5.2 ESTRUCTURA DEL LIPOPOLISACÁRIDO

El LPS es uno de los componentes estructurales más característicos de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que ayuda a mantener la estabilidad de dicha membrana.

El LPS está formado por tres regiones distintas: el lípido A, que ancla el LPS a la membrana externa; el polisacárido central (*core*) y la cadena lateral O (Fig. 1.18) (Le Brun y cols., 2013). La región del **lípido A** es el componente hidrofóbico, conteniendo de cuatro a siete cadenas de ácidos grasos unidas a dos derivados del azúcar glucosamida. El lípido A es a menudo citotóxico representando el componente biológicamente activo, de modo que el LPS podrá actuar como una endotoxina y causar algunos de los síntomas que se desarrollan en las infecciones causadas por bacterias Gram negativas. Sin embargo, para que se produzca una respuesta citotóxica en los animales es necesario que esté presente la molécula completa. El **polisacárido central** está formado por 10 azúcares, entre los que podemos destacar las heptosas, la galactosa y el cetodesoxioctonato (KDO), que sirve de unión entre el lípido A y el cuerpo del LPS. La **cadena lateral O** ó polisacárido O específico, es una cadena de polisacáridos que se extiende hacia fuera. La composición en azúcares varía extraordinariamente según la cepa bacteriana, pero consta generalmente de galactosa, glucosa, ramnosa y manosa así como de uno o más dideoxiazúcares poco frecuentes como la abecuesa, colitosa, paratosa o tivelosa. Estos azúcares se unen entre sí formando secuencias de 4 ó 5 azúcares que se repiten para formar el lipopolisacárido O. Las cadenas O son reconocidas muy fácilmente por los anticuerpos del huésped, sin embargo las bacterias Gram negativas pueden incapacitar las defensas del huésped modificando la naturaleza de sus cadenas O para evitar ser identificadas.

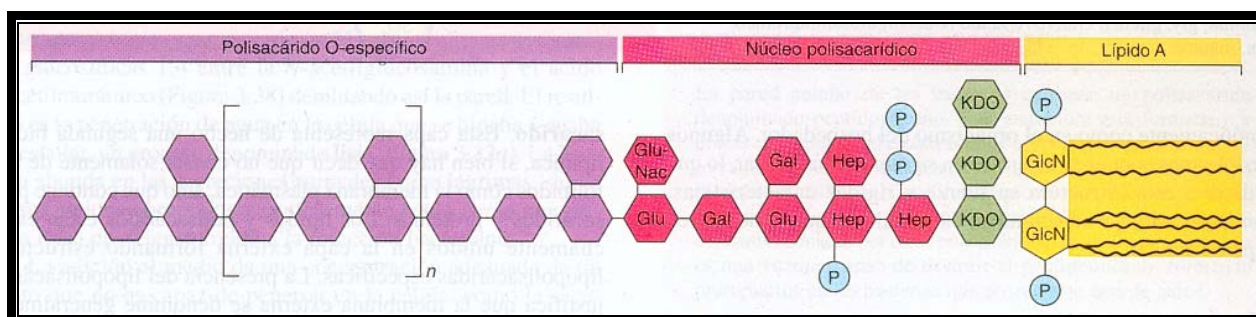


Figura 1.18.- Estructura del lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas señalando las tres partes principales en las que se divide. KDO: cetodesoxioctonato, Hep: heptosa, Glu: glucosa, Gal: galactosa, GluNac: N-acetilglucosamida, GlcN: glucosamida. Tomada de Madigan y cols., 1999.

### 1.5.3 LAS CITOCINAS

Se denomina de forma genérica citocinas a un conjunto de proteínas de bajo peso molecular y vida media relativamente corta, que se sintetizan fundamentalmente en las células del sistema inmune, en respuesta a distintos patógenos o a sus productos. Las citocinas se producen en los primeros momentos de la activación celular, para alertar a las células que poseen en sus membranas receptores para las mismas, y así desencadenar una respuesta inmune. La mayoría de las citocinas son sintetizadas por macrófagos y linfocitos T (concretamente por los linfocitos Th, o “linfocitos T helper”). Sin embargo, también son capaces de sintetizarlas otras células del sistema inmune, así como las células endoteliales, los mastocitos y los hepatocitos. Las citocinas son moléculas muy potentes, que actúan a muy bajas concentraciones y poseen gran afinidad de unión con sus receptores.

Las citocinas que son producidas por monocitos o macrófagos se denominan monocinas y si se liberan a partir de los linfocitos, linfocinas (Cominelli, 1993). Por otra parte, teniendo en cuenta las funciones que realizan, se pueden clasificar en tres grandes grupos (Van Miert, 1994):

- ✓ Citocinas que actúan como estimuladoras o inhibidoras de los factores de crecimiento: IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 y GM-CSF.
- ✓ Citocinas con propiedades pro-inflamatorias: TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , y la IL-8.
- ✓ Citocinas que actúan como factores anti-inflamatorios: IL-1ra, receptores solubles de la IL-1 y proteínas de unión del TNF- $\alpha$  y de la IL-1.

Para realizar sus funciones las citocinas deben unirse a los receptores de membrana de las células diana, lo que produce una cascada de reacciones bioquímicas en el interior celular que se traducen en una regulación de su actividad, estimulando o inhibiendo sus funciones. Las citocinas actúan como “hormonas” del sistema inmune. Están implicadas en la respuesta inmune innata debido a la activación de linfocitos NK y macrófagos y en la respuesta inmune específica, tanto humoral como celular, actuando sobre los linfocitos T y B. También poseen un importante papel en la regulación de la hematopoyesis.

### 1.5.4 EFECTOS PRODUCIDOS POR EL LPS Y LAS CITOCINAS

Muchos de los efectos tóxicos de las bacterias Gram negativas son debidos al LPS, endotoxina termoestable que se libera en grandes cantidades tras la lisis celular. El LPS es el responsable de una cascada de acontecimientos asociados con las infecciones por este tipo de bacterias, que de forma simplificada se representan en la Fig. 1.19.

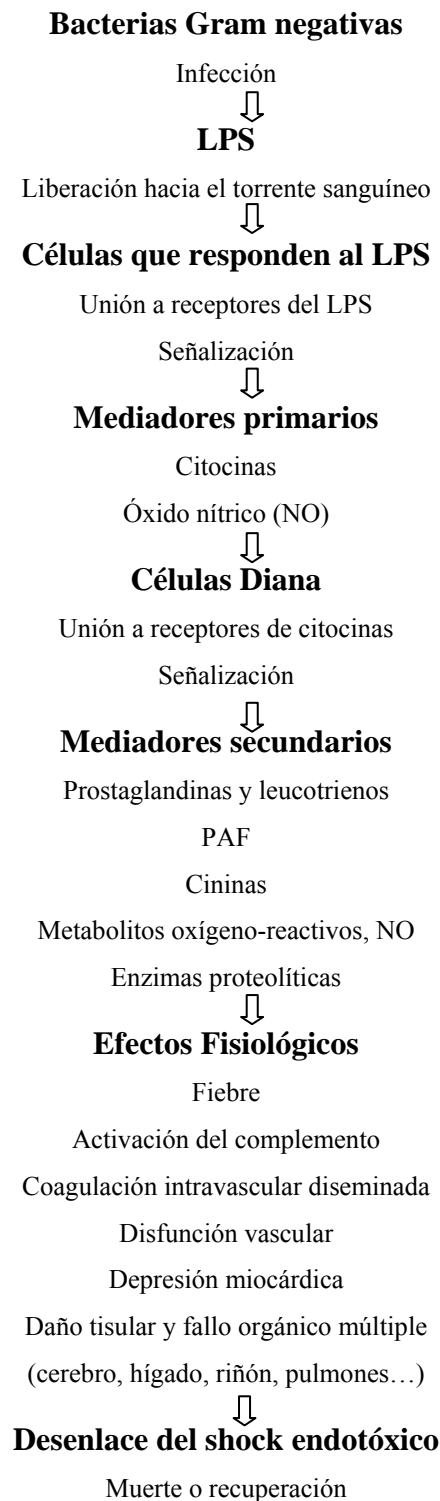


Figura 1.19.- Esquema simplificado de la cascada del shock endotóxico (Chaby, 1999).



En la Fig. 1.20 se muestra la cascada de activación del LPS. El reconocimiento de esta endotoxina por parte de las células de la respuesta inmune está mediado al menos por 4 moléculas: la proteína de unión al LPS (LBP), el CD14, la MD-2 y el receptor *toll-like* 4 (TLR4) (Miyake, 2007). Para que se produzca el reconocimiento del LPS, y posterior señalización intracelular por parte del receptor TLR4, es necesario que el LPS se encuentre unido a una proteína sérica denominada LBP (*LPS-binding protein*) (Viriyakosol y Kirkland, 1995). LBP funciona como una opsonina de partículas que contienen LPS, incluyendo a bacterias Gram negativas enteras, facilitando la unión de estas partículas con el CD14 presente en las células mieloides (Ulevitch y Tobias, 1995). El CD14 es una glicoproteína que puede encontrarse anclada a una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI) en la membrana de monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, o bien, soluble en la circulación (Ulevitch y Tobias, 1995). El CD14 se asocia físicamente con un complejo proteico que incluye al TLR4 y una proteína accesoria, MD-2. Parece ser que el complejo TLR4/MD-2 es el responsable del reconocimiento directo de diferentes estructuras del LPS, que varían en función de la especie, proporcionando una alta especificidad al receptor (Akashi y cols., 2000; Shimazu y cols., 1999).

La unión del LPS al TLR4 inicia una cascada de reacciones que culmina con la translocación del NF $\kappa$ B al núcleo. En reposo, el NF $\kappa$ B se encuentra unido a proteínas inhibitorias como el I $\kappa$ B. Tras producirse el estímulo, el I $\kappa$ B es fosforilado por el complejo IKK y se separa del NF $\kappa$ B, que se transloca hacia el núcleo e induce la transcripción de genes (Iwai y Tokunaga, 2009).

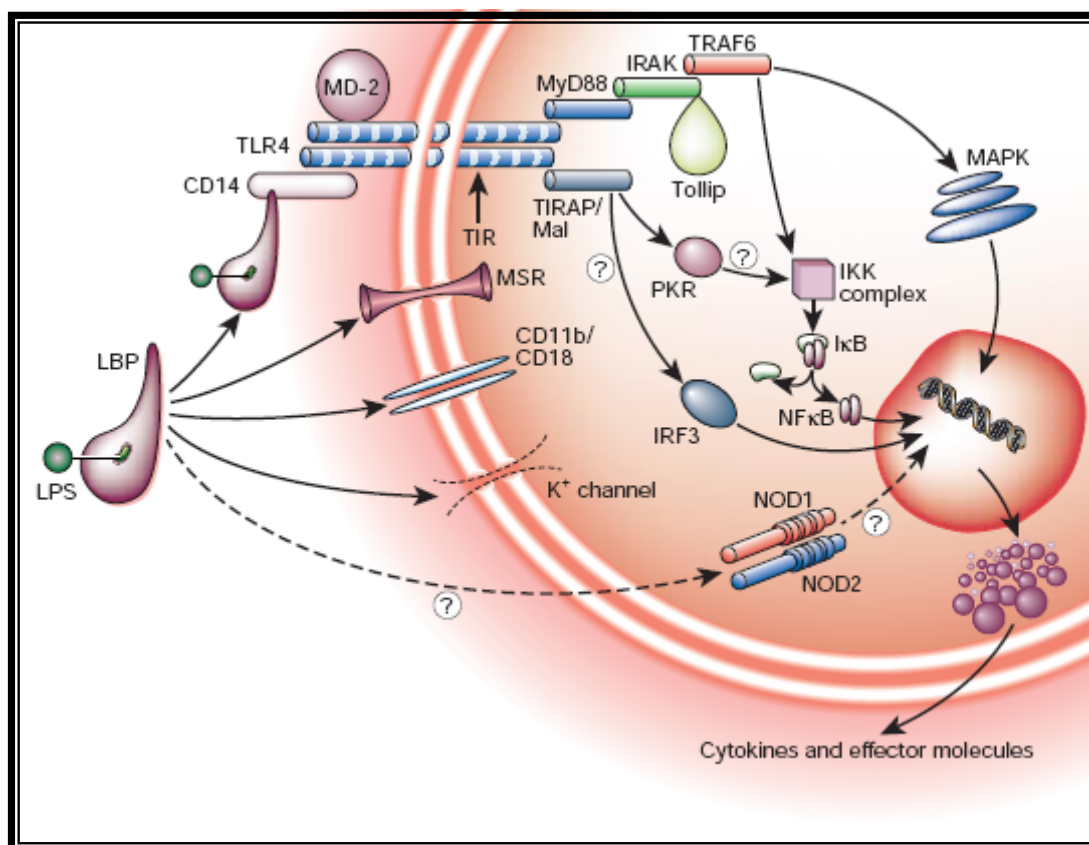


Figura 1.20.- Cascada de activación del LPS. La unión del LPS al TLR4 recluta varias proteínas, entre otras a la MyD88, TIRAP, TRIF (a través de la proteína TRAM) y a las MAPKs, como la p38, JNK y ERK. Finalmente, se activan factores de transcripción de genes, como el NFκB y los factores reguladores de interferón (IRFs), que inducen la transcripción de citoquinas proinflamatorias. Tomada de Cohen, 2002.

Cuando las endotoxinas son inyectadas experimentalmente a un animal, le provocan una serie de síntomas que se engloban bajo la denominación de “respuesta de fase aguda” (APR). Entre ellos, cabe destacar: fiebre, escalofríos, disnea, taquicardia, inapetencia, diarrea, disminución de las secreciones gástricas, inhibición de la tasa de vaciamiento gástrico, activación de linfocitos y neutrófilos, movilización de fagocitos, disminución de las tasas plasmáticas de hierro y zinc, reducción del número de leucocitos y plaquetas y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Van Miert, 1990). Hay que tener en cuenta que el LPS a dosis altas puede llegar a causar la muerte debido a la aparición de un síndrome de disfunción multiorgánica que cursa con insuficiencia circulatoria, daño tisular inducido por los leucocitos, activación de los sistemas de coagulación, etc. (Brun-Buisson, 1995).

El inicio de la respuesta de fase aguda, parece estar causado por la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 (Kilbourn y cols., 1990a y b). Las citoquinas a su vez producen degranulación de mastocitos, macrófagos y neutrófilos, y la liberación de una serie de mediadores endógenos como el factor activador plaquetario (PAF), las PGs, el tromboxano, los leucotrienos, la vasopresina, el NO, etc. Todos estos mediadores son los responsables de la aparición de los distintos síntomas descritos

anteriormente. Existen a su vez otros mediadores antiinflamatorios que contribuyen a la modulación de esta respuesta.

La respuesta febril es uno de los signos más manifiestos de los procesos infecciosos. El LPS actúa como un pirógeno exógeno y ejerce su efecto estimulando distintos tipos de células del sistema inmune para que liberen mediadores solubles llamados pirógenos endógenos, que son los verdaderos responsables de la fiebre, actuando en el SNC. Entre estos pirógenos endógenos destacan las citocinas, fundamentalmente la IL-1 (Kluger, 1991), IL-6 (Klir y cols., 1993) y el TNF- $\alpha$  (Watanabe, 1992), que son las principales responsables de que la señal pirogénica llegue a la región termorreguladora del cerebro localizada en el área preóptica (POA) del hipotálamo.

También se han descrito alteraciones inducidas por el LPS en el tracto GI. Así, el LPS administrado por vía endovenosa en la oveja (Duranton y Buéno, 1984, Plaza y cols., 1997b) y cabra (van Miert y cols., 1992), inhibe las contracciones de los preestómagos y provoca un descenso en la actividad mioeléctrica del área antroduodenal durante varias horas, acompañado de un aumento de la frecuencia de los MMCs. En oveja anestesiada, la inyección endovenosa de la toxina produce en los preestómagos una respuesta muy bien tipificada: existe un periodo de latencia de 10-13 min, seguido de una repentina y total parada del retículo-rumen que dura 20-40 min. Posteriormente las contracciones van reapareciendo y vuelven a la normalidad al cabo de 20 min o más. Se ha comprobado que esta respuesta se debe a una relajación inicial del músculo retículo-ruminal seguida de una posterior y prolongada depresión de los centros gástricos del bulbo raquídeo, en el SNC (Leek y van Miert, 1971).

En el conejo (Fioramonti y cols., 1984) y en la rata (Pons y cols., 1989), el LPS interrumpe los MMCs y los reemplaza por una serie de grupos de potenciales de acción que se propagan aboralmente. En el cerdo, produce una inhibición transitoria de la actividad eléctrica gastroduodenal (De Saedeleer y cols., 1991).

También se han descrito efectos del LPS sobre el tránsito intestinal. Cullen y cols. en 1997, estudiaron el efecto de la endotoxina sobre la motilidad y el tránsito intestinal en perros, tras la administración de alimento líquido. Se observa una disminución de la frecuencia de contracciones y de la fuerza contráctil en el yeyuno, junto con un aumento del tránsito yeyunal, asociado a un mayor porcentaje de ondas de presión propagadas aboralmente. En el colon, la endotoxina aumenta temporalmente la velocidad del tránsito de líquidos e incrementa la frecuencia y fuerza de las contracciones cólicas. Estos hechos podrían contribuir a la diarrea que aparece durante la endotoxemia.

Como ya hemos comentado anteriormente, las citocinas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de los efectos producidos por el LPS. Nuestro grupo ha descrito

previamente que la liberación de IL-1 $\beta$  (Plaza y cols., 1997b) y de TNF- $\alpha$  (Guerrero-Lindner y cols., 2003) en el SNC juegan un papel primordial en el desencadenamiento de la fiebre y de los trastornos motores GI inducidos por la administración endovenosa de LPS en la oveja. Así, la administración icv de ambas citocinas reproduce los efectos del LPS, mientras que la inyección icv del antagonista de los receptores de la IL-1 $\beta$  (IL-1ra) o del receptor soluble del TNF (TNFR:Fc) reduce los efectos provocados por la endotoxina. Estas citocinas, a su vez, ejercen sus efectos a través de la liberación de prostaglandinas en el SNC (Plaza y cols., 1997b, Guerrero-Lindner y cols., 2003).

## 1.6 LAS PROSTAGLANDINAS (PGs)

Las PGs, tromboxanos y leucotrienos son los principales miembros de una gran familia de derivados de ácidos grasos endógenos que se sintetizan a partir de los fosfolípidos de membrana de la mayor parte de las células de los mamíferos y que se conocen con el nombre de eicosanoides.

Los eicosanoides se pueden sintetizar a partir de células endoteliales vasculares, células del músculo liso, neutrófilos, macrófagos, plaquetas y otros tipos celulares. Las PGs y los leucotrienos no se almacenan en el interior de las células sino que difunden al medio inmediatamente después de su síntesis, para iniciar una gran variedad de actividades biológicas. Los eicosanoides están implicados en numerosas funciones celulares importantes para mantener la homeostasis celular, pero también contribuyen en el amplio espectro de efectos celulares que se producen en la inflamación y como respuesta a una invasión bacteriana.

Tanto el LPS como las citocinas estimulan la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), una enzima de la membrana celular que hidroliza fosfolípidos de membrana liberando ácido araquidónico y lisofosfolípidos (Fig. 1.21). Estos a su vez darán lugar a la liberación de PGs, tromboxanos, leucotrienos y PAF, que serán potenciales mediadores de los efectos observados en casos de endotoxemias.

El ácido araquidónico es el principal precursor de los eicosanoides. Es un ácido graso esencial que se encuentra unido a los fosfolípidos de membrana por un enlace éster. Las PLA<sub>2</sub> implicadas en la generación de eicosanoides son la citosólica (cPLA<sub>2</sub>) y las secretadas (sPLA<sub>2</sub>), en particular los grupos IIA, V y X. Tras la liberación del ácido araquidónico, queda un residuo lisofosfolípido en la membrana celular que posteriormente será acetilado para formar el factor PAF. El ácido araquidónico liberado, puede ser metabolizado en el citoplasma por enzimas diferentes: la ciclooxigenasa (COX) o la lipooxigenasa. La COX es la principal enzima productora de PGs y presenta dos isoformas: la COX-1, considerada clásicamente como constitutiva, presente prácticamente en todos tipos celulares a niveles constantes y la COX-2, considerada inducible por ciertos estímulos asociados a la

inflamación, como el LPS o las citocinas. La COX cataliza la transformación del ácido araquidónico en  $\text{PGG}_2$ , la cual, por la acción de una peroxidasa, se transforma en la  $\text{PGH}_2$ . A partir de la  $\text{PGH}_2$  y mediante la acción de varias isomerasas, se forman el tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), la  $\text{PGI}_2$ , la  $\text{PGD}_2$  y la  $\text{PGE}_2$ . Este paso final de síntesis de  $\text{PGE}_2$  es catalizado por unas enzimas denominadas sintasas de PGEs (PGES), tanto citosólicas (cPGES) como ligadas a membranas intracelulares, llamadas también microsomales (mPGES).

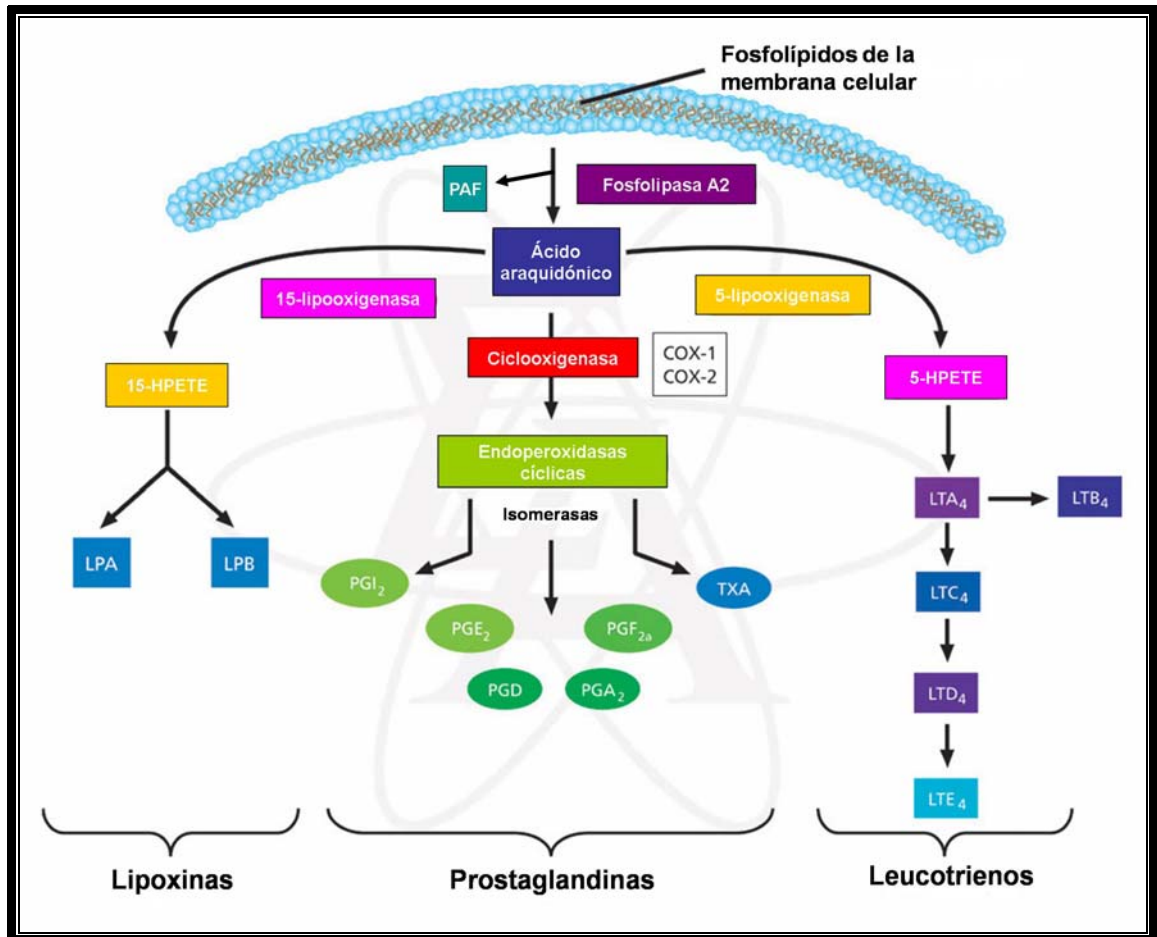


Figura 1.21.- Diagrama esquemático de la producción de eicosanoides. PAF: factor activador plaquetario; HPETE: ácido hidroxiperoxi-eicosatetraenoico; COX: ciclooxigenasa; LP: lipoxina; PG: prostaglandina; TX: tromboxano; LT: leucotrieno. Modificado de [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).

La COX-1 y la COX-2 son casi idénticas en estructura pero tienen importantes diferencias en su selectividad por el sustrato y en su localización intracelular (Vane y cols., 1998). La COX-1 y COX-2 ovinas son homodímeros de 600 y 603 aminoácidos, respectivamente.

Las PGs protectoras son sintetizadas por la COX-1, y preservan la integridad de las paredes mucosas del estómago e intestino y mantienen la función renal normal en el riñón comprometido. La COX-2, además de ser inducida en lesiones inflamatorias, está presente constitutivamente en el cerebro y médula espinal, donde podría estar involucrada en la transmisión nerviosa, en particular aquella relacionada con el dolor y la fiebre. Las PGs

sintetizadas por la COX-2 son también importantes en la ovulación y el parto (Vane y cols., 1998).

La COX implicada en las síntesis de PGs en la fiebre parece ser la COX-2, ya que en experimentos con ratones que carecían de los genes que codificaban para la COX-2, el LPS no era capaz de provocar fiebre (Engblom y cols., 2003, Li y cols., 1999). Además, el empleo de inhibidores específicos frente a dicha enzima bloquea la respuesta febril en varias especies como el hombre (Li y cols., 1999, Schwartz y cols., 1999), la rata (Cao y cols., 1997), el ratón (Li y cols., 2001), el gato (McCann y cols., 2005), la cobaya (Steiner y cols., 2001) y la oveja (Castro, 2010).

La COX-2 es una proteína que, en algunos tejidos, apenas se expresa en condiciones fisiológicas, pero los estímulos inflamatorios provocan un fuerte aumento de su síntesis (Smith y cols., 2000, Katori y Majima, 2000, Wu, 1995) incluyendo macrófagos pulmonares, monocitos sanguíneos (Hempel y cols., 1994), riñón, pulmón (Feng y cols., 1993), y células endoteliales (Maier y cols., 1990, Habib y cols., 1993). Así, la inyección intravenosa de LPS aumenta la síntesis del mRNA de la COX-2 y su inmunorreactividad en el endotelio de la vasculatura cerebral, en las meninges y microglía, mientras que la expresión de la COX-1 permanece invariable (Cao y cols., 1995, Lacroix y Rivest, 1998, Vane y cols., 1998). El aumento del mRNA de la COX-2 es detectable a los 30 minutos de la inyección de la endotoxina, tanto en cerebro como en órganos periféricos (Ivanov y cols., 2002).

En estudios farmacológicos de inhibición de la COX-1 no se han encontrado evidencias de la participación de esta enzima en al menos la fase II de la fiebre en la rata (Dogan y cols., 2002, Zhang y cols., 2003). Aunque existen algunos estudios *in vivo* donde se observa un aumento en la expresión de la COX-1 tras la inyección de LPS (Vellucci y Parrott, 1998) o en peritonitis causada por varios patógenos (Stamme y cols., 1999), se considera generalmente que esta isoforma es resistente a la regulación por incremento transcripcional. Aunque la enzima implicada en la producción de fiebre en respuesta a la inyección del LPS es la COX-2, algunos componentes de dicha respuesta parecen depender de la COX-1, como la activación de neuronas de algunos núcleos hipotalámicos (Zhang y cols., 2003).

### **1.6.1 PAPEL DE LAS PGs EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL Y EN LA FIEBRE**

Las PGs están presentes en el tracto GI, estando involucradas en procesos fisiológicos y patológicos. Concretamente, las PGs de las series E, F e I son sintetizadas en grandes cantidades a este nivel (Bennet y Flescher, 1970) e intervienen en la fisiología y

fisiopatología digestiva, alterando la secreción de moco, el transporte de agua y electrolitos, la circulación sanguínea y la motilidad (Robert, 1991). La síntesis de PGE<sub>2</sub> en el tracto GI se ha descrito principalmente en el subepitelio del colon (Cravin y De Rubertis, 1983) y en las capas musculares del intestino delgado (Sanders y Ros, 1978). Se han detectado tasas elevadas de esta PG asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal (Gould y cols., 1977).

Los **efectos contráctiles** de los prostanoïdes y sus análogos en el tracto GI están mediados por regla general por acciones directas sobre el músculo liso, aunque existen casos en los que se observa una acción indirecta mediada por el sistema nervioso entérico (Poll y cols, 1988; Fukunaga y cols., 1993).

Los efectos de las PGs sobre el tracto GI, examinados *in vitro*, muestran una considerable variabilidad dependiendo del tipo de PG, dosis, especie e, incluso, la capa muscular estudiada. Se ha mostrado que el músculo longitudinal tanto del intestino delgado como del grueso se contrae por la PGE y PGF<sub>2α</sub>, mientras que el músculo circular se relaja por el tipo E pero se contrae por el tipo F. En este sentido, en estudios *in vitro* realizados en músculo liso de colon proximal y distal de conejo, la PGE<sub>2</sub> provoca contracción en preparaciones longitudinales y relajación en las circulares (Burakoff y Percy, 1992). Paralelamente, en estudios *in vitro* realizados en el fundus gástrico de la rata, los grupos de PGs E y F producían contracción en preparaciones tanto longitudinales como circulares (Splawinski y cols., 1971). Tanto la PGE<sub>2</sub> como la PGF<sub>2α</sub> incrementan la actividad contráctil en el músculo liso del colon del gato (Wienbeck y Sperling, 1984).

Las diferencias en los efectos de las PGs aplicadas en la superficie mucosal o serosal complican aún más la interpretación de los resultados observados. Así, la PGE<sub>1</sub> aplicada serosalmente en segmentos aislados de íleon de cobaya da lugar a una disminución en la propulsión del contenido intraluminal (Bennett y cols., 1968a), pero la capa longitudinal no se ve afectada cuando la PGE<sub>1</sub> se coloca en el lumen, probablemente debido a que es metabolizada antes de alcanzar el músculo longitudinal o bien porque no es absorbida (Holmes y cols., 1963).

La relajación se produce por una acción directa de las PGs sobre receptores de células del músculo liso, mientras que las respuestas excitatorias podrían estar mediadas ya sea a través de nervios intrínsecos o de estructuras no neuronales (Bennett y cols., 1968b).

Estudios realizados *in vivo* sobre el colon proximal de conejo, indican que la PGE<sub>2</sub> a dosis bajas produce una inhibición de la actividad mioeléctrica, mientras que a dosis altas provoca un aumento de dicha actividad. La administración de PGE<sub>2</sub> en cerdos produce una inhibición de la motilidad antral, aumenta el periodo entre MMCs e incrementa la actividad eléctrica de la fase II en el íleon de la misma especie (De Saedeleer y cols., 1992). En el perro, la administración de PGE<sub>2</sub> inmediatamente antes de la fase III produce su abolición, y

tiene un efecto inhibidor de la motilidad *in vitro* (Frantzides y cols., 1992). En este mismo estudio, la administración *in vitro* de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  producía contracciones del músculo liso, dependientes del calcio y no neurogénicas. La infusión *iv* de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGI}_2$  disminuye la frecuencia de los MMCs en perros en ayunas, mientras que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  interrumpe los MMCs (Thor y cols., 1985) y produce contracciones fásicas cuando se administra en la fase I (Frantzides y cols., 1992).

Otros estudios indican que las PGs de los tipos E y A, pero no del F, administrados por vía oral o parenteral, reducen la cantidad de ácido y pepsina en estómagos innervados y denervados, tanto en animales conscientes como anestesiados. Esta inhibición es no selectiva y su grado depende no solo de la dosis de PG sino también del estímulo para la secreción de ácido (Nezamis y cols., 1971).

Bajo condiciones experimentales, la PGEs o  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inducen frecuentemente diarrea. Las PGs son conocidas por afectar al transporte de agua y electrolitos a través de numerosas membranas biológicas, pero teniendo en cuenta el potente efecto de las PGs sobre el músculo liso GI, se piensa que esta diarrea estaba causada por la estimulación de la motilidad GI (Bennett y Fleshler, 1970).

En estudios *in vitro* sobre mucosa ileal aislada de conejo, la  $\text{PGE}_1$ ,  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inhibían la absorción de sodio y estimulaban la secreción de cloro (Greenough y cols., 1969; Awqati y cols., 1970; Awqati y cols., 1972). Una posible explicación a las alteraciones en el transporte de agua y electrolitos es que las PGs modifiquen los niveles de AMPc.

También se ha documentado que las PGs están implicadas en los trastornos motores GI observados tras la administración de LPS,  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ . Así, la fiebre y la hipomotilidad gastroduodenal producidas en la oveja por la administración *iv* de LPS e *icv* de  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{TNF-}\alpha$  están mediadas por la liberación de PGs en el sistema nervioso central, ya que la administración *icv* previa de indometacina (inhibidor no específico de la COX) y nimesulida (inhibidor específico de la COX-2), reducen los efectos inducidos por estos agentes (Plaza y cols., 1997b; Guerrero-Lindner y cols., 2003; Castro, 2010). En ratas, la inyección de LPS produce un enlentecimiento del tránsito GI, un aumento de la concentración sanguínea de metabolitos del NO y de la concentración intestinal de  $\text{PGE}_2$ , alcanzándose picos de  $\text{PGE}_2$  a las 4 horas de la administración de la endotoxina (Liang y cols., 2005). En el conejo, el tratamiento con indometacina revierte el descenso en la contractilidad del intestino delgado inducido por el LPS (Rebollar y cols., 2002).

Existe una clara evidencia de que la  **$\text{PGE}_2$**  interviene en la producción de la fiebre inducida por el LPS y por la  $\text{IL-1}\beta$  (Kluger, 1991), dado que la administración de indometacina (inhibidor de la COX), consigue bloquear la hipertermia provocada por la endotoxina. Además la  $\text{PGE}_2$  es capaz de producir fiebre al administrarla por vía *icv* en



conejo (Morimoto y cols., 1988a) y en cabras (6-8  $\mu\text{g/kg}$ ), en las que se observan escalofríos, un aumento rápido y agudo de la temperatura corporal, con una inhibición de las contracciones ruminales (van Miert y cols., 1983). Estos síntomas coinciden con los observados en la endotoxemia. Por otro lado, la inyección periférica de IL-1 o de endotoxina, estimula la síntesis de PGs en el cerebro de rata (Komaki y cols., 1992).

Además, se ha demostrado mediante experimentos con ratones deficientes en los genes que codifican para el receptor de  $\text{PGE}_2$ , que este prostanoide es indispensable para el desencadenamiento de la fiebre inducida por el LPS (Ushikubi y cols., 1998, Oka y cols., 2003a).

Se han propuesto al menos cuatro mecanismos para explicar el paso de la señal de las moléculas proinflamatorias periféricas hacia el cerebro para causar la fiebre. Así, las citocinas circulantes podrían atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) a través de un sistema de transporte saturable (Banks y cols., 1989) o por difusión a través de la membrana basal (Mercier y cols., 2003). Otros autores afirman que podrían entrar a través de los capilares fenestrados del órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) (Blatteis y cols., 1983) o que la señal fuera transmitida a través de vías vagales (Morimoto y cols., 1987; Cooper y Rothwell, 1991). Otra teoría señala que son las propias células de la BHE las que transmiten la señal sintetizando ellas mismas las PGs. Así, la administración periférica de LPS,  $\text{TNF-}\alpha$  o  $\text{IL-1}\beta$  induce rápidamente la expresión de las enzimas productoras de  $\text{PGE}_2$  en el endotelio vascular y las células perivasculares por todo el cerebro (Yamagata y cols., 2001; Ek y cols., 2001). Los pirógenos y sus mediadores podrían actuar inhibiendo a las neuronas termosensibles del área preóptica del hipotálamo, lo que inhibiría las respuestas encaminadas a la pérdida de calor (Mackowiak y Boulant, 1996).

Se ha sugerido la implicación de otros prostanoideos en la génesis de la fiebre. En el conejo, la administración de dosis pequeñas de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y de  $\text{PGE}_2$  en determinadas regiones del cerebro produce fiebre (Morimoto y cols., 1988b). Sin embargo, la fiebre originada por la administración icv de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  difiere de la originada por la  $\text{PGE}_2$ , estimulando la termogénesis por mecanismos distintos a los de la  $\text{PGE}_2$ . La administración icv de  $\text{PGI}_2$  induce fiebre en distintas especies (Akarsu y Ayhan, 1993; Gollman y Rudy, 1988; Kandasamy y Williams, 1982) mientras que la  $\text{PGD}_2$  y el  $\text{TXA}_2$  no producen respuesta febril (Gollman y Rudy, 1988; Sirko y cols., 1989).

## 1.7 RECEPTORES DE LA $\text{PGE}_2$ (EPs)

Entre las diferentes PGs, se considera que la  $\text{PGE}_2$  es la más importante en la regulación de las funciones del tracto GI, incluyendo la protección de la mucosa gástrica y la motilidad. Además, también está implicada en varias patologías como la enfermedad

inflamatoria intestinal (IBD) (Ahrenstedt y cols., 1994), enfermedades bacterianas enteroinvasivas (Reseta y Barrett, 2002) y cánceres colorrectales (Eberhart y cols., 1994).

La diversidad de las funciones celulares de la PGE<sub>2</sub> se atribuye a su unión a 4 subtipos de receptores acoplados a proteínas G denominados receptores EP (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>), por lo que la expresión de éstos será crítica a la hora de determinar las funciones biológicas de la PGE<sub>2</sub>. Son codificados por diferentes genes y están bien conservados en mamíferos, desde el ratón hasta el hombre. Todos estos subtipos están expresados en la membrana plasmática; además, el EP<sub>3</sub> y el EP<sub>4</sub> pueden mostrar una localización en la membrana nuclear (Bhattacharya y cols., 1998) (Figs. 1.22 y 1.23).

Estos receptores pueden agruparse en tres categorías en base a la transducción de la señal y su acción:

- **Receptores inductores de relajación (EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub>):** asociados a proteínas G, actúan a través del aumento del AMPc e inducen relajación del músculo liso.

- **Receptores inductores de contracción (EP<sub>1</sub>):** activan el fosfatidilinositol y actúan a través de la movilización de Ca<sup>2+</sup> como segundo mensajero, induciendo contracción del músculo liso.

- **Receptores inhibitorios (EP<sub>3</sub>):** inhiben la adenilato ciclasa por medio de proteínas Gi, por lo que disminuyen el AMPc e inhiben la relajación del músculo liso.

En los receptores funcionalmente relacionados, la homología en su secuencia es más alta que entre aquellos pertenecientes a las tres diferentes categorías. Existen exones adicionales que codifican los extremos carboxi-terminales en algunos de los receptores de prostanoïdes, y el *splicing* alternativo de estos exones da lugar a varias isoformas. Esto se ha observado en el caso del receptor EP<sub>3</sub> de rata, ratón, bóvidos, conejo y hombre (Narumiya y cols., 1999). Las isoformas del receptor EP<sub>3</sub> tienen especificidades de unión al ligando prácticamente idénticas. Sin embargo, las isoformas del receptor EP<sub>3</sub> bovino están asociadas a diferentes proteínas G e inducen diferentes vías de señalización (Namba y cols., 1993), mientras que las del EP<sub>3</sub> del ratón difieren en su eficacia de acoplamiento de la proteína G (Sugimoto y cols., 1993), en su sensibilidad a la desensibilización inducida por agonistas (Negishi y cols., 1993) y en su grado de actividad constitutiva (Hasegawa y cols., 1996). Dado que los dominios carboxi-terminales de algunas isoformas del receptor EP<sub>3</sub> son similares entre especies, mientras que otros dominios no muestran mucha homología, se ha propuesto la posible existencia de al menos siete isoformas del receptor EP<sub>3</sub> en cualquiera de las especies dadas. Otra variante del receptor ha sido descrita en el caso del receptor EP<sub>1</sub> en ratón (Okuda y cols., 1996).

La fiebre inducida por el LPS, la IL-1 $\beta$  y la PGE<sub>2</sub> está mediada principalmente por el receptor EP<sub>3</sub> (Ushikubi y cols., 1998, Oka y cols., 2003a). Entre los receptores de la PGE<sub>2</sub> presentes en el área preóptica del hipotálamo, el EP<sub>3</sub> es el más abundante (Nakamura y cols., 1999, Yoshida y cols., 2003), concretamente en la zona que rodea el OVLT (Sugimoto y cols., 1994). Además, se ha postulado que en la primera fase de la fiebre estaría implicado el receptor EP<sub>1</sub> mientras que la segunda estaría mediada por el receptor EP<sub>3</sub> (Oka y cols., 2003a, 2003b).

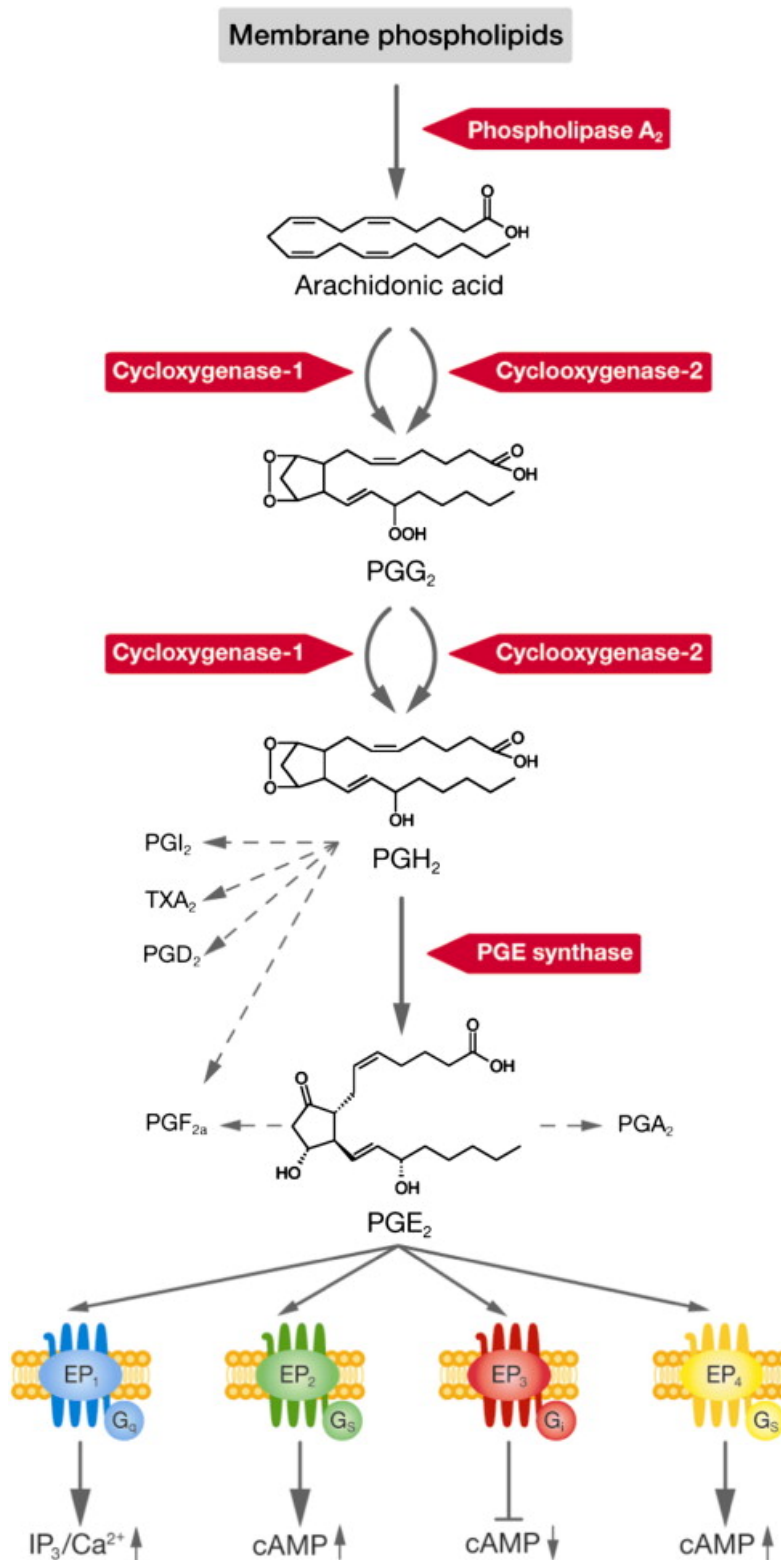


Figura 1.22.- Biosíntesis de la PGE<sub>2</sub> y receptores sobre los que actúa. El ácido araquidónico es liberado a partir de fosfolípidos de la membrana por medio la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> y da lugar a la PGG<sub>2</sub> y la PGH<sub>2</sub> por medio de la acción de las enzimas COX-1 y COX-2. La PGE<sub>2</sub> se forma a partir de la PGH<sub>2</sub> y se une para activar cuatro subtipos de receptores, denominados receptores EP<sub>1</sub> a EP<sub>4</sub>. Están asociados a proteínas G con la consiguiente activación de vías de transducción de señales. Tomada de Konya y cols., 2013.

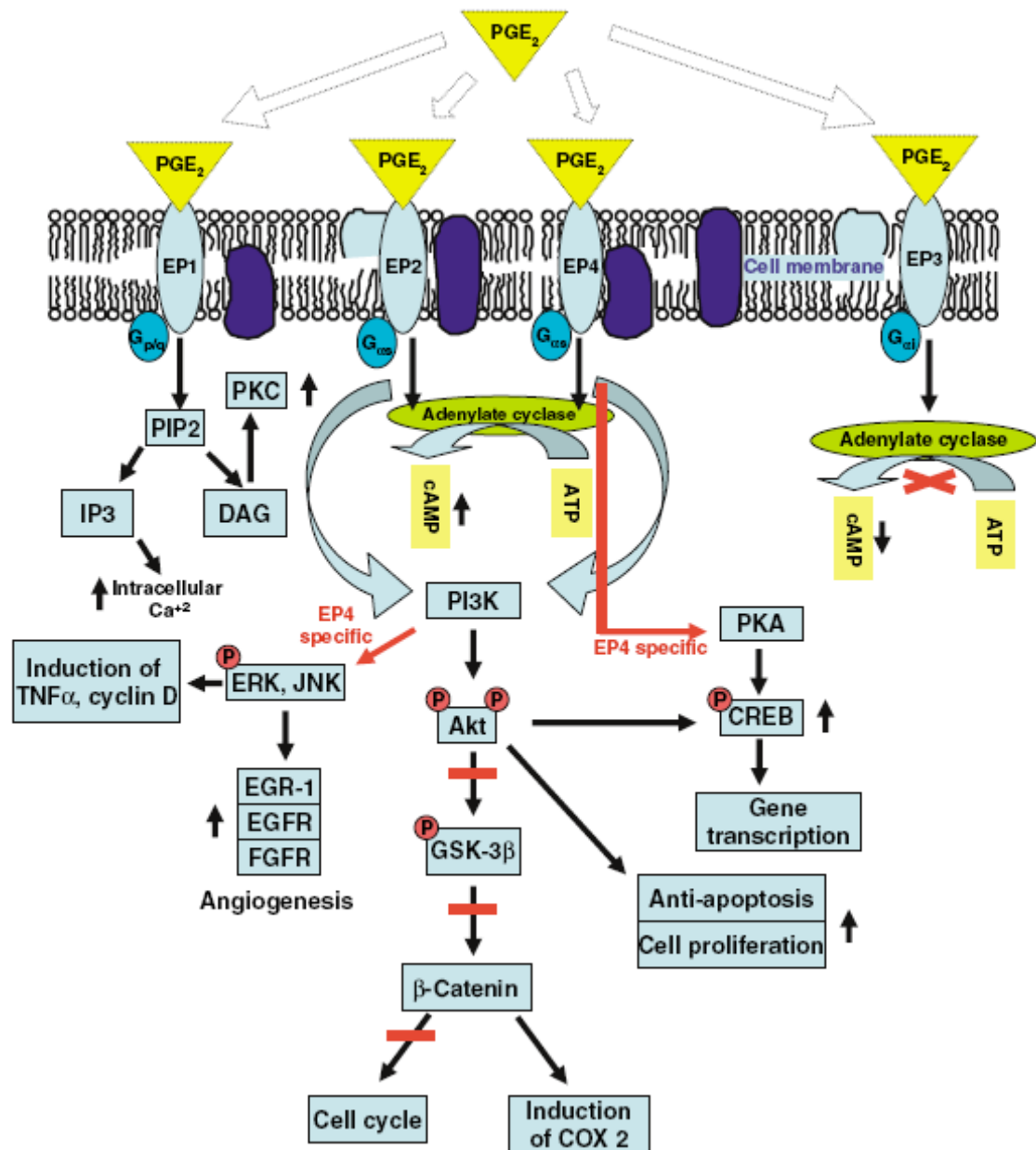


Figura 1.23.- Vías de señalización de los receptores EP de la PGE<sub>2</sub>. Cuatro tipos principales de receptores EP están involucrados en la vía de señalización mediada a través de proteínas G y de diferentes segundos mensajeros. La PGE<sub>2</sub> induce un aumento de Ca<sup>2+</sup> o AMPc intracelular al acoplarse con los receptores EP<sub>1</sub> o EP<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub> respectivamente. Sin embargo, induce una disminución del AMPc intracelular al unirse a receptores EP<sub>3</sub>. AC: adenilato ciclasa. DAG: diacilglicerol. IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato. PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol difosfato. PKA: proteína cinasa A. PKC: proteína cinasa C. PI3K: fosfoinosítidos-3-cinasa. Akt: proteína cinasa B. ERK: proteína cinasa regulada por señales extracelulares. JNK: c-Jun N-terminal cinasa. EGR-1: respuesta temprana de crecimiento 1. EGFR: factor de crecimiento epidérmico. FGFR: factor de crecimiento de fibroblastos. GSK-3β: glucógeno sintasa cinasa-3. Tomada de Dey y cols., 2006.

### 1.7.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs)

Los receptores contráctiles **EP<sub>1</sub>** tienen una distribución muy amplia en la mayoría de las especies, siendo más abundantes en cobayas y roedores. En el hombre, estos receptores han sido descritos en el miometrio (Senior y cols., 1991), venas pulmonares (Norel y cols., 2004), mastocitos (Wang y Lau, 2006), músculo longitudinal del colon (Smid y Svensson, 2009) y queratinocitos (Konger y cols., 2009). Estudios de Northern blot en ratón identificaron el receptor EP<sub>1</sub> en pulmón, estómago y riñón (Watabe y cols., 1993). En estas localizaciones se ha descrito que este receptor está implicado en la contracción de vías aéreas (Tilley y cols., 2003), secreción de surfactante en células alveolares tipo II (Morsy y cols., 2001), secreción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el estómago en respuesta a la acidificación de la mucosa (Takeuchi y cols., 2006) o inhibición de la absorción de Na<sup>+</sup> en el conducto colector renal (Guan y cols., 1998). Mediante el empleo de modelos animales se ha establecido un vínculo directo entre el receptor EP<sub>1</sub> y el cáncer de colon (Watanabe y cols., 1999). A nivel central, la microinyección de PGE<sub>2</sub> en el hipotálamo ventromedial produce un efecto antinociceptivo mediado por el receptor EP<sub>1</sub> (Hosoi y cols., 1999) y la estimulación de este receptor ha mostrado inducir hipertermia (Oka y Hori, 1994).

Los receptores **EP<sub>2</sub>** están ampliamente distribuidos y, en sus diferentes localizaciones, inducen relajación, como es el caso de la broncodilatación inducida por la PGE<sub>2</sub> en preparaciones bronquiales en el hombre (Norel y cols., 1999) y en el ratón (Tilley y cols., 2003). Otros estudios han relacionado cambios en la expresión de este receptor con el embarazo y parto, disminuyendo al término de la gestación (Aistle y cols., 2005) y aumentando durante el parto (Grigsby y cols., 2006) para facilitar la distensión uterina. Lo mismo sucede en el caso de los receptores EP<sub>4</sub>, si bien el acoplamiento funcional al AMPc parece ser menos eficiente en el caso de este receptor en comparación con el EP<sub>2</sub>.

Los receptores **EP<sub>3</sub>** tienen una distribución muy amplia, poseyendo un importante papel en el SNC y en los sistemas cardiovascular, reproductor y renal, y se han implicado en el cáncer, inflamación y regulación inmune. Estudios de Northern blot han mostrado que el mRNA del receptor EP<sub>3</sub> era el más abundante en el cerebro (Sugimoto y cols., 1994), expresándose en neuronas hipotalámicas del núcleo preóptico medial rodeando al OVLT, una estructura carente de barrera hematoencefálica. Por ello, este receptor podría estar involucrado en la génesis de la fiebre.

La distribución de los receptores de las PGs depende de la especie animal, pero de manera general y gracias a estudios de Northern blot e hibridación *in situ* se ha mostrado que casi todos los tipos y subtipos de los receptores de los prostanoideos se expresan a lo largo del tracto GI. Así, la expresión de los receptores EP a lo largo del tracto GI será crítica para las funciones que realice la PGE<sub>2</sub>.

En la **oveja** no se ha estudiado la distribución de los receptores EP en el tejido GI, pero sí en otras especies animales (Dey y cols., 2006).

En el caso del **ratón**, se ha detectado el mRNA del receptor EP<sub>1</sub> en la *muscularis mucosae* del estómago, y en menor cantidad, del esófago e intestino, donde este receptor está implicado en movimientos locales y en el plegamiento de la mucosa. El mRNA del receptor EP<sub>3</sub> se ha localizado en los miocitos de la capa muscular longitudinal de todo el tracto GI, pero no en la capa circular. Así mismo, se ha localizado en glándulas fúndicas y en las neuronas del plexo mientérico. El receptor EP<sub>3</sub> podría regular la contracción del músculo liso, directa o indirectamente a través del sistema nervioso entérico. El mRNA del receptor EP<sub>4</sub> ha sido detectado en las glándulas del antro gástrico, indicando que podría mediar la producción de moco. Además, se ha localizado en células epiteliales, especialmente en la parte superior de las vellosidades y parece estar implicado en los procesos diarreicos en los que interviene la PGE<sub>2</sub>. En este estudio, no se encontraron evidencias de la presencia del mRNA del receptor EP<sub>2</sub> en el tracto GI del ratón (Morimoto y cols., 1997; Narumiya y cols., 1999). Sin embargo, otros autores por medio de Northern blot describen una abundante expresión del receptor EP<sub>2</sub> en el estómago e íleon (Katsuyama y cols., 1995).

En la **rata** se ha detectado la presencia del mRNA de los cuatro receptores en células mucosas del estómago y en células caliciformes del intestino delgado y grueso, indicando que las PGs podrían desempeñar un papel en la secreción mucosa de estos órganos. Los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> también se han encontrado en ganglios entéricos (Northey y cols., 2000). El mRNA del receptor EP<sub>1</sub> se ha localizado en las capas musculares del estómago, intestino delgado y colon. Por su parte, el receptor EP<sub>3</sub> se ha identificado en las capas musculares del intestino, pero no del estómago, donde se ha observado en la mucosa, especialmente en células parietales (Ding y cols., 1997).

Así, en el **conejo**, se ha determinado la expresión de los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> y EP<sub>3</sub> en células epiteliales de las vellosidades intestinales y en neuronas entéricas, así como de EP<sub>3</sub> en el músculo liso GI. En este estudio no se ha detectado expresión de EP<sub>4</sub> en ninguno de los segmentos (Grasa y cols., 2006). Otros autores sí describen la presencia de EP<sub>4</sub> en células epiteliales gástricas en esta especie (Takahashi y cols., 1999).

En el íleon de **cobayas** se ha detectado la presencia de receptores EP<sub>2</sub> en neuronas entéricas (Lawrence y cols., 1992).

En el **hombre**, la expresión de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>3</sub> se limita a la superficie luminal del epitelio gástrico y al ápice de la mucosa del colon. La expresión del receptor EP<sub>4</sub> es modesta en el epitelio gástrico pero intensa en células mononucleares de la lámina propia (Takafuji y cols., 2000).

## 1.8 MACRÓFAGOS COMO MODULADORES DE LA INMUNIDAD

### 1.8.1 MACRÓFAGOS HEPÁTICOS Y PULMONARES

Estudios previos de nuestro grupo determinaron que la administración iv de PGE<sub>2</sub>, a dosis que no modifican la temperatura corporal, disminuía la motilidad GI, de forma similar a los efectos observados tras la administración iv de LPS (Guerrero-Lindner, 2002), sugiriendo un posible papel de las PGs periféricas en las alteraciones motoras digestivas inducidas por la endotoxina.

En cuanto a la procedencia de dichas prostaglandinas, observamos por estudios de WB e IHC que la administración de LPS en la oveja no aumenta la expresión de COX-1 o COX-2 en el tracto GI (Castro, 2010) descartando así estos tejidos en la síntesis periférica de las PGs. Por otra parte, dado que el LPS era inyectado por la vena yugular, cuya sangre alcanza rápidamente el pulmón y que tanto el pulmón como el hígado son órganos que poseen numerosas células del sistema inmune, consideramos la posibilidad de que las PGs periféricas pudieran ser sintetizadas en macrófagos pulmonares o hepáticos y liberadas al torrente circulatorio. Estas PGs, a su vez, podrían transmitir la señal hasta el cerebro. Otros autores también han descrito que los efectos inhibitorios de la PGE<sub>2</sub> sobre la motilidad GI se podrían deber a su interacción con receptores tanto centrales como periféricos (van Miert, 1998).

El hígado es uno de los principales órganos encargados de eliminar sustancias exógenas y productos de desecho de la circulación sanguínea. Dado que es el principal órgano de eliminación del LPS circulante (Fox y cols., 1990), los macrófagos hepáticos o **células de Kupffer** son responsables de esta eliminación y están implicadas en la producción de citocinas y PGE<sub>2</sub> y, por tanto, también en la fiebre inducida por el LPS.

Las células de Kupffer derivan de monocitos circulantes y son el mayor grupo de macrófagos residentes del cuerpo, suponiendo de un 80 a un 90% de la población total de macrófagos tisulares (Bioulac-Sage y cols., 1996). Estas células se sitúan en el espacio vascular sinusoidal, y predominan en el espacio periportal, lugar donde están perfectamente situadas para eliminar las endotoxinas que circulan por los sinusoides y fagocitar microorganismos. Asimismo, las células de Kupffer pueden pasar a través del espacio de Dissé y contactar directamente con los hepatocitos, de forma que cuando éstos son apoptóticos, los fagocitan (Fig. 1.24).

Tras la activación de las células de Kupffer por varios estímulos bacterianos, incluidos los lipopolisacáridos, liberan mediadores de la inflamación como eicosanoides, NO, TNF- $\alpha$  y otras citocinas importantes en la modulación de la proliferación y diferenciación de otras células, representando así una parte importante de la defensa inmune innata. Una elevada exposición de las células de Kupffer a productos bacterianos, especialmente endotoxinas,



puede conducir a una intensa producción de mediadores inflamatorios y, por último, a daño hepático (Kmiec, 2001).

El papel fundamental de las células de Kupffer en el desencadenamiento de la fiebre inducida por el LPS iv quedó demostrado en un estudio realizado en cobayas en las que se producía la depleción de las células de Kupffer mediante la administración de cloruro de gadolinio (GdCl<sub>3</sub>). A diferencia del aumento de la temperatura y de los niveles de PGE<sub>2</sub> producidos en el área preóptica por la administración iv de LPS, las cobayas pretratadas con GdCl<sub>3</sub> mostraron una bajada de la temperatura corporal mientras que los niveles de PGE<sub>2</sub> en el área preóptica no se modificaron (Sehic y cols., 1997).

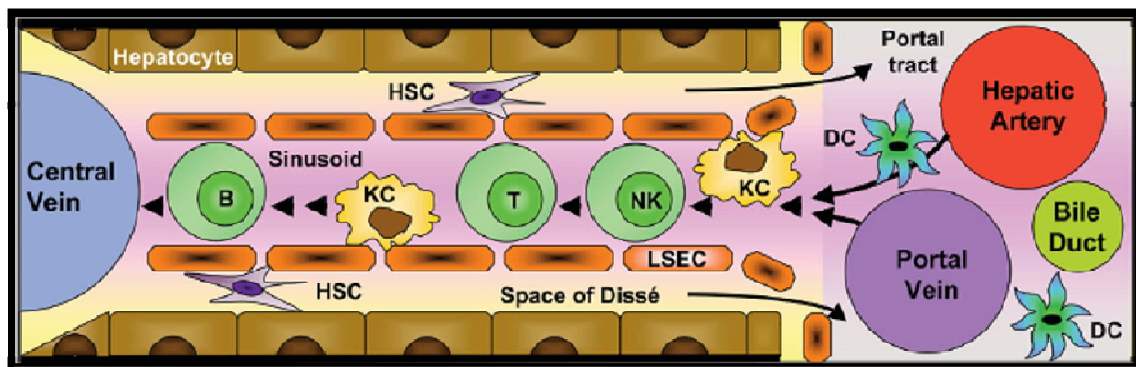


Figura 1.24.- Células inmunitarias en el hígado sano. LSEC: células endoteliales sinusoidales. B: linfocitos B. T: linfocitos T. DC: células dendríticas. HSC: células estrelladas hepáticas. KC: células de Kupffer. NK: células natural killer. Tomada de Racanelli y Rehmann, 2006.

El hígado, bazo y médula ósea han sido clásicamente los lugares donde se ha descrito la presencia de macrófagos con acceso directo a la sangre circulante. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que ovejas, terneros, caballos y cerdos tienen a nivel pulmonar una importante captación de partículas, bacterias o endotoxinas cuando se inyectan por vía iv.

Ovejas y cabras experimentan un aumento en la reactividad vascular pulmonar conforme aumentan de edad (Longworth y cols., 1992). Por lo tanto, al aumentar la edad, el sitio principal de eliminación de partículas extrañas inyectadas iv cambia del hígado a los pulmones. Este cambio se ha relacionado con la colonización perinatal del pulmón por monocitos que se replican y diferencian en una nueva población de grandes y muy activos macrófagos residentes, conocidos como **macrófagos pulmonares intravasculares** (PIMs). La colonización del pulmón por los PIMs ocurre o bien después del nacimiento en algunas especies (PIMs constitutivos), o bien tras la estimulación con LPS o en condiciones como la cirrosis (PIMs inducidos).

Estos PIMs tienen entre 20 y 80 µm de diámetro y se localizan ligados al endotelio de los capilares pulmonares. Se ha estimado que el número de PIMs en el parénquima pulmonar ovino y porcino es similar al de células de Kupffer hepáticas en rata (Winkler,

1988). Concretamente, la mayor concentración de PIMs se ha documentado en el pulmón ovino, los cuales cubren un 20% del endotelio de los capilares (Warner y cols., 1986). Además, se estimó que en la oveja (Warner y cols., 1986), cerdo (Carrasco y cols., 1996a) y ciervo (Carrasco y cols., 1996b) el número de PIMs era superior al de macrófagos alveolares.

Varios estudios han mostrado una eritrofagocitosis por PIMs en cabras (Atwal y cols., 1985), ovejas (Warner y cols., 1987) y gatos (Schneeberger y Burger, 1970), sugiriendo que éstos puedan desempeñar un papel en la eliminación normal de eritrocitos envejecidos, restos celulares y fibrina durante la inflamación.

Un estudio en 13 especies diferentes mostró similares cinéticas de aclaramiento de partículas inyectadas vía iv en oveja, cerdo, cabra y gato con una elevada captación en el pulmón en comparación con el mono, conejo, rata, ratón, cobaya y pollo. En comparación, este segundo grupo de especies mostró mayoritariamente captación de partículas por células de Kupffer en el hígado (Brain y cols., 1999).

En óvidos, Warner y cols., (1987) mostraron que, tras la administración iv de *Pseudomonas aeruginosa*, la captación a nivel pulmonar era superior al 90%. Un estudio posterior de este mismo grupo (1988) mostró una captación pulmonar similar de endotoxina radiomarcada en oveja.

Sin embargo, las especies que presentan PIMs pueden tener también una depuración hepática eficaz. Cuando las partículas o las bacterias entran a través del intestino y se presentan primero en el hígado a través de la circulación portal, serán eliminadas principalmente por las células de Kupffer y la captación hepática será mucho mayor (DeCamp y cols., 1992). Curiosamente, esto no ocurre con el LPS, ya que cuando es inyectado en la vena porta puede eludir la captación hepática, ser secuestrado en los pulmones, e iniciar allí la inflamación (DeCamp y cols., 1992).

### **1.8.2 MICROGLÍA O MACRÓFAGOS CEREBRALES**

Las células de la microglía son la población de macrófagos residentes en el cerebro (Hanisch y Kettenmann, 2007) y están implicadas en la vigilancia inmunitaria del parénquima cerebral (Marín-Teva y cols., 2012; Prinz y Mildner, 2011). Por características morfológicas, proliferativas e histoquímicas, se puede clasificar a la microglía como un tipo de fagocito mononuclear cerebral. Durante el desarrollo, los monocitos invaden el cerebro y se van diferenciando para llegar a ser células de la microglía.

Las células de la microglía se encuentran dispersas en el tejido nervioso y, ante una lesión o un estímulo inmunitario, se transforman desde un fenotipo en reposo a uno activado. Éstas últimas células migran al sitio de la lesión, liberan citocinas y otras

sustancias indicadoras de neuroinflamación (Hanisch, 2002). Posteriormente, liberan moléculas citotóxicas como el NO y especies reactivas del oxígeno y se transforman en fagocitos para limpiar el sitio de la lesión de patógenos y desechos celulares.

Otros estudios ponen de manifiesto que las células de la microglía también desempeñan un papel funcional en el cerebro normal, de forma que expresarían neurotransmisores y receptores neuro-hormonales que las capacitarían para detectar la actividad neuronal y astrocítica (Pocock y cols., 2007).



## **2.- OBJETIVOS**



Uno de los principales factores que limitan la rentabilidad de las explotaciones ganaderas de pequeños rumiantes es la mortalidad y otras pérdidas económicas en el proceso productivo, causadas por enfermedades infecciosas. Entre las patologías de etiología infecciosa destacan las septicémicas, así como aquellas que afectan al tracto gastrointestinal (GI) o respiratorio. Concretamente, las gastroenteritis son las que constituyen la principal causa de mortalidad neonatal, siendo responsables del 60 al 70% de las muertes de origen infeccioso en los corderos.

Por ello, el objetivo general del presente trabajo de investigación ha sido el estudio de los mecanismos fisiopatológicos responsables de la fiebre y de las alteraciones motoras GI inducidas en la oveja por una endotoxina bacteriana: el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*.

Nuestra hipótesis de partida es que el LPS aumenta la expresión de la COX a nivel periférico en macrófagos hepáticos y/o pulmonares. Esta COX produciría una liberación de PGs en el torrente circulatorio, que activarían la síntesis de citocinas y PGs en el SNC, y éstas últimas serían las responsables de la fiebre y de las alteraciones motoras GI observadas. Por ello, para la realización de esta Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar en el cerebro los tipos de receptores de la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>) que podrían estar implicados en la fiebre y en las alteraciones motoras GI inducidas por el LPS en la oveja.
2. Localizar los receptores de la PGE<sub>2</sub> en el hipotálamo, bulbo raquídeo, rumen, antro gástrico e intestino delgado de la oveja, así como valorar la posible alteración que el LPS pudiera ejercer en la expresión de dichos receptores.
3. Determinar los tipos celulares que están implicados en la síntesis y liberación de PGs en el hipotálamo y bulbo raquídeo.
4. Valorar la posible participación de los macrófagos hepáticos y pulmonares en la síntesis periférica de PGs, como posible vía de señalización del LPS al SNC en la oveja.





### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1 ANIMALES Y MANTENIMIENTO

A lo largo de todo el manejo, se siguió la legislación vigente en materia de protección de animales para experimentación: Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (B.O.E. nº 252 de 21 de octubre de 2005, pp: 34367-34391); Ley 11/2003 de 19 de marzo, de protección animal en la Comunidad Autónoma de Aragón (B.O.A. nº 35 de 26 de marzo, pp: 3956-3972) y la trasposición de la Directiva Comunitaria acordada en Estrasburgo, sobre la protección de los animales utilizados con fines experimentales y otros fines científicos (86/609/CEE) (B.O.E. nº 256 de 25 de Octubre de 1990, pp: 31348-31362). Además, antes de comenzar el trabajo, los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI05-09 de 24-2-2009 y PI15-10 de 15-3-2010).

Para la realización del presente trabajo hemos utilizado ovejas de la raza Rasa Aragonesa, de 5-6 años de edad y 50-60 kg de peso vivo. Antes de comenzar con la experimentación, los animales eran desparasitados con albendazol (11,5 mg/kg, Albendex 10%, SP Veterinaria, Tarragona) por vía oral e ivermectina (200 µg/kg, Ivomec, Merial, Madrid) por vía subcutánea (sc) y se les realizaban pruebas analíticas para determinar que estaban exentas de brucelosis.

Las ovejas eran alimentadas una vez al día con un heno de alfalfa estándar (700 g/día) cuya composición era: 85% de materia seca, 17% de proteína bruta, 30% de fibra bruta y 2 Mcal/kg materia seca de energía metabolizable.

Este heno era suplementado con pienso (300 g/día) cuya composición era: 55% de cebada, 20% de maíz, 21% de soja y 4% de corrector maxinatural.

Además, los animales disponían *ad libitum* de bloques con suplementos minerales (Norbloq, Norel S.A., Madrid), cuya composición era de cloruro de sodio en un 97% y contenía los siguientes aditivos: Óxido manganeso (60 mg/kg), sulfato de cobre pentahidratado (50 mg/kg), sulfato de zinc monohidratado (40 mg/kg), sulfato ferroso monohidratado (40 mg/kg), ioduro de potasio (30 mg/kg), sulfato de cobalto monohidratado (20 mg/kg), selenito de sodio (2 mg/kg). Sus constituyentes analíticos eran los siguientes: sodio (38,00%), magnesio (0,62%), potasio (0,29%) y calcio (0,23%).

Con el fin de realizar los registros electromiográficos, las ovejas se mantenían en jaulas metabólicas de suelo plano que permitían al animal cierta libertad de movimientos al mismo tiempo que impedían los desplazamientos que harían imposible los registros continuos (Fig. 3.4). En estas jaulas, el tiempo de permanencia se distribuía en periodos que se alternaban con unos días en jaulas de suelo para que los animales se mantuviesen en condiciones óptimas.

En el estabulario se mantenía un fotoperiodo constante de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, iniciándose la fase de luz a las 8:00. La temperatura se mantenía constante entre 18 y 20 °C.

### 3.2 ESTUDIOS DE MOTILIDAD GASTROINTESTINAL *IN VIVO*

Con el objetivo de analizar la motilidad digestiva en ovejas conscientes se empleó la técnica de la electromiografía.

#### 3.2.1 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Los animales eran sometidos a un periodo de ayuno previo a la cirugía de 24 horas, disponiendo de agua *ad libitum* hasta 12 horas antes de la intervención.

Inicialmente, se procedía a realizar la premedicación de los animales mediante la administración intravenosa (iv) de xilazina (0,2 mg/kg, Xilagesic 2%, Laboratorios Calier, Barcelona) y clorhidrato de ketamina (0,4 mg/kg, Imalgene 1000, Merial, Barcelona). Se completaba la inducción anestésica con propofol iv (4-5 mg/kg, Vetofol, Esteve, Barcelona) y se procedía a realizar la intubación endotraqueal. El mantenimiento de la anestesia se realizó con isoflurano al 2,5% y oxígeno al 3%.

Con la oveja colocada en decúbito lateral izquierdo y la zona de abordaje (pared abdominal lateral derecha) rasurada y lavada con jabón germicida, se realizaba una incisión paracostal (5-6 cm por detrás del hipocondrio), que permitiera el acceso al aparato digestivo.

Para registrar la actividad mioeléctrica se implantaron electrodos (Microfil Industries SA, Renens, Suiza) constituidos por un hilo de aleación níquel/cromo (80%/20%), de 0,12 mm de diámetro y 1,2 m de longitud y recubiertos por una triple capa aislante de éster de poliimida. Se eliminaba la capa protectora de uno de los extremos del electrodo para implantarlo en la pared muscular según el procedimiento descrito en la Figura 3.1.

Se implantaron grupos de tres electrodos intraparietales, con una distancia entre cada uno de aproximadamente 5 mm, en la capa muscular de las siguientes estructuras: dos grupos en el saco dorsal del rumen, dos en el antro abomasal, dos en el duodeno, y seis en el yeyuno. Para ello se siguió la técnica descrita por Ruckebusch y cols. en 1968 y modificada por Ruckebusch en 1970. La reacción fibroserosa que se desarrolla entre las 24 y 48 horas después de la intervención, asegura un perfecto enquistamiento del electrodo en la pared del órgano (Fig. 3.1).

Para registrar la temperatura corporal de forma continua, se introducía en la cavidad abdominal una sonda termosensible compuesta por un termistor (tipo NTC, Farnell, Leeds, Reino Unido) soldado a dos cables recubiertos de silicona.

Los extremos libres de los electrodos y los cables de la sonda termosensible eran reagrupados por la parte superior de las incisiones quirúrgicas, pasados por vía subcutánea y exteriorizados en el dorso del animal.

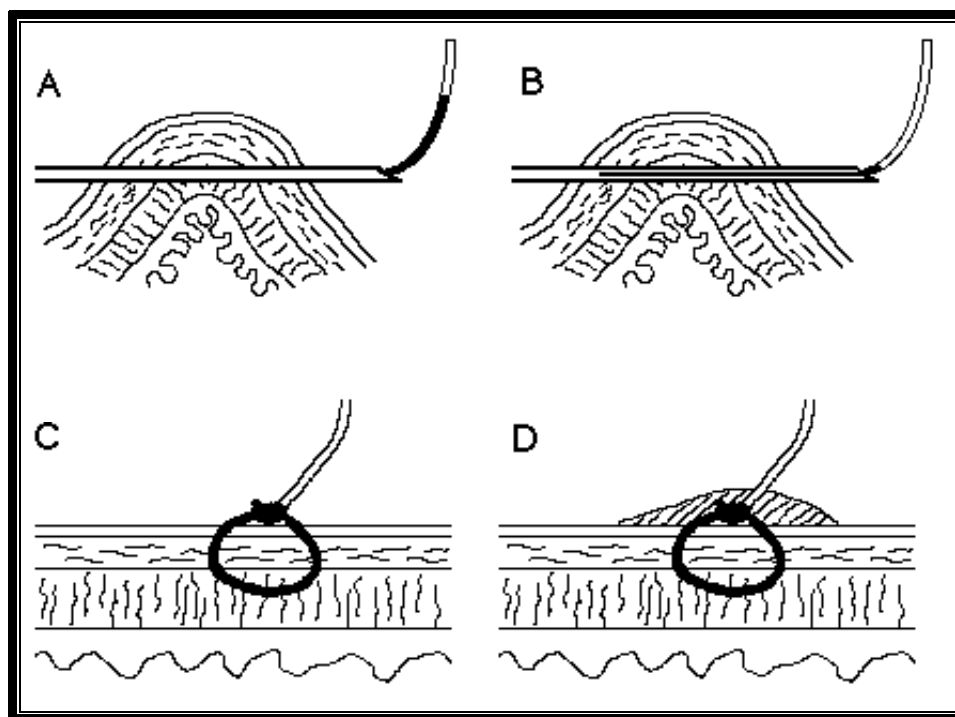


Figura 3.1.- Técnica de implantación crónica de electrodos intraparietales o intramurales. A: Con una aguja hipodérmica (que actuaba a modo de trócar) se atravesaba la pared muscular en 2 ó 3 mm, y a través de ella se introducía el extremo del electrodo (sin aislante, en negro). B: Se retiraba la aguja, dejando el límite de la capa aislante del electrodo a nivel de la serosa. C: El electrodo se fijaba a la pared por medio de un bucle. D: Una reacción fibroserosa aseguraba el aislamiento del conjunto. Tomado de Ruckebusch y cols., 1968.

En la misma intervención quirúrgica se colocaba una cánula intracerebroventricular (icv) para proceder posteriormente a administrar agentes a nivel del sistema nervioso central, siguiendo la técnica descrita por Buéno y cols. en 1983. Se realizaba una incisión cutánea sagital de 5-6 cm a la altura de la línea que une los conductos auditivos con la base del cráneo. Posteriormente se trepanaba el hueso frontal derecho, a 0,75 cm de la sutura media frontal y a 1 cm por delante de la sutura frontoparietal. A través de este orificio se insertaba una cánula de acero de 24 mm de longitud y 2 mm de diámetro externo, cuyo extremo se situaba a 2-4 mm del techo del ventrículo lateral derecho del cerebro (Fig. 3.2). La cánula de acero estaba soldada a una placa de latón de 4 cm de largo, 1 cm de ancho y 2 mm de espesor. Ésta se fijaba al hueso frontal mediante dos tornillos de osteosíntesis.

Durante el transcurso de toda la intervención las estructuras eran irrigadas con solución salina fisiológica (Braun, Barcelona) y las suturas fueron desinfectadas con gentamicina y cubiertas con un aerosol de aluminio (Aluspray Aerosol, Vetoquinol, Madrid) para proteger y favorecer la cicatrización.

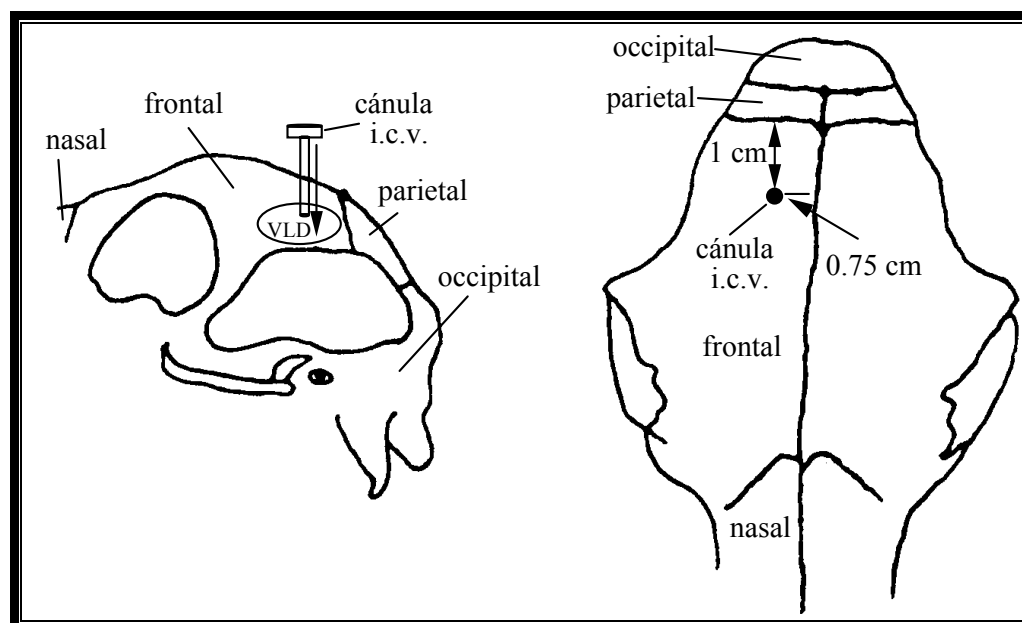


Figura 3.2.- Esquema de la implantación de la cánula intracerebroventricular (icv), siguiendo la técnica descrita por Buéno y cols., 1983.

Para estimular la actividad respiratoria postoperatoria, se administraba por vía iv clorhidrato de doxapram (5-10 mg/kg, Docatone-V, Fort Dodge Veterinaria, Girona).

El mismo día de las intervenciones se administraba por vía intramuscular (im) un antibiótico de amplio espectro como es la oxitetraciclina (20-40 mg/ kg, Terramicina 100, Pfizer, Madrid) y se repetía esta antibioterapia cada 3 días. Para prevenir el dolor postoperatorio, se utilizó como antiinflamatorio meloxicam (0,2 mg/kg, Metacam, Boehringer Ingelheim, Barcelona) por vía sc cada 24 horas, y se repetía dicha pauta durante los 3 días posteriores a la operación. Si los animales mostraban signos de dolor, el meloxicam era administrado cada 12 horas.

Para tratar posibles íleos paráliticos y estimular la motilidad ruminal se administró un parasimpaticomimético como es la neostigmina (0,5 mg/kg, Neostigmina, Braun, Barcelona) por vía sc cada 12 horas. En estos casos además se administró menbutona, derivado del ácido propiónico, para normalizar el funcionamiento digestivo (0,1 g/kg, Rapifan, Boehringer Ingelheim, Barcelona), por vía im cada 24 horas; un estimulante metabólico a base de fósforo orgánico con vitamina B12 (1 ml/kg, Catosal, Bayer, Barcelona) por vía im cada 24 horas; y un ruminatorio (25 g/animal, Rumiol, Laboratorios Pino, Cantabria) por vía oral cada 24 horas.

La herida quirúrgica era vigilada durante el periodo postoperatorio y a las dos semanas de la intervención se retiraban los puntos y grapas. Además, durante todo este tiempo se monitorizaba la temperatura corporal con el fin de controlar el estado del animal.

### 3.2.2 REGISTROS DE TEMPERATURA CORPORAL

La temperatura corporal era medida mediante un termómetro electrónico de 4 canales basado en un termistor, desarrollado por el Servicio de Instrumentación Electrónica de la Universidad de Zaragoza. El aparato estaba calibrado para dar una salida inicial de 0 voltios a 35 °C, con una sensibilidad de 400 mV/°C.

Posteriormente, la señal era captada por un conversor analógico digital (ADC-16, Pico Technology Ltd., Cambridge, Reino Unido), con una resolución de 16 bits (512 puntos de resolución), que la transmitía a un ordenador con una frecuencia de muestreo de 3 muestras/min/canal. Los datos se representaban en la pantalla de un ordenador y se grababan en el disco duro a través de un programa informático diseñado por el Servicio de Instrumentación Electrónica de la Universidad de Zaragoza basado en el software LabView v7 (National Instruments, Texas, EE.UU.). Los datos se exportaban a ficheros Excel y GraphPad Prism para su análisis.

### 3.2.3 REGISTROS ELECTROMIOGRÁFICOS

Denominamos **ondas lentas** o **ritmo eléctrico de base** a las oscilaciones rítmicas y espontáneas del potencial de la membrana celular en reposo de las células musculares del tracto gastrointestinal de los mamíferos. Cuando la membrana supera el potencial umbral, se desencadena un conjunto de potenciales de acción denominado **salva de potencial**, que producirá la contracción. Ruckebush en 1970 demostró en la oveja que existía una buena correlación entre las salvas de potencial y las contracciones de la musculatura gastrointestinal, por lo que la representación de la actividad mioeléctrica era directamente proporcional a la amplitud de la contracción. Por tanto, se utiliza de forma frecuente la electromiografía como estimación de la motilidad gastrointestinal (Fig. 3.3).

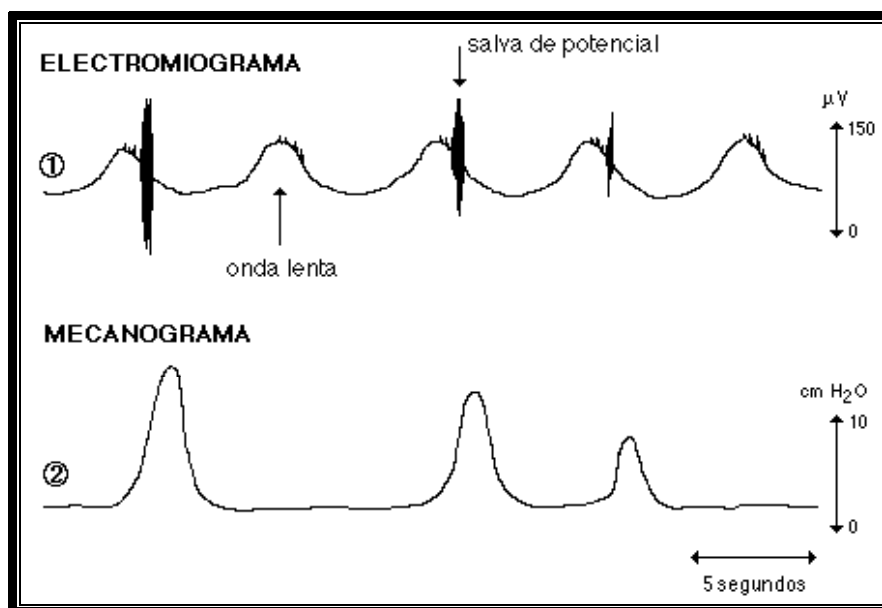


Figura 3.3.- Representación simultánea de la actividad mioeléctrica (1) y mecánica (2), según Ruckebusch y cols., 1981.

La actividad eléctrica a diferentes niveles del tracto digestivo puede ser registrada durante varias semanas mediante la técnica de electromiografía a partir de electrodos intraparietales desarrollada por Ruckebusch y cols., 1968 y modificada por Ruckebusch en 1970. Los extremos libres de los electrodos (desprovistos de la lámina de protección) se conectaban mediante clavijas a un panel de entrada para poder llevar a cabo los registros electromiográficos. La señal eléctrica ajena a los electrodos implantados se eliminaba conectando al animal a la toma de tierra del panel mediante un cable soldado a un imperdible fijado de forma subcutánea en la oveja.

La señal eléctrica pasaba a una caja de conmutación para seleccionar las combinaciones de electrodos y posteriormente a un amplificador de alta ganancia (MT8P, Lectromed, St Peter Jersey Channel Islands, Reino Unido) con 8 unidades de amplificación. Seguidamente, la señal era filtrada mediante filtros pasa-altos (15 Hz) y pasa-bajos (50 Hz). Los filtros pasa-altos (EMG-FU8CH Pb 40010, Panlab, Barcelona) permiten atenuar las ondas lentas, y observar sólo las salvas de potencial. Los filtros pasa-bajos, presentes en los amplificadores, eliminan ruidos de fondo de frecuencia elevada que no pertenecen al sistema (corriente de red, medio externo...).

Un conversor analógico digital (MP100, Biopac Systems Inc, SDR Clinical Technology, Sydney, Australia) recogía la señal mioeléctrica amplificada y filtrada con una resolución de 16 bits, y era transmitida a un ordenador. El programa de adquisición de datos Acqknowledge v3.8 (Biopac Systems Inc) almacenaba todos los datos del registro en el disco duro con una frecuencia de muestreo de 100 muestras/segundo/canal. Este programa informático también permitía visualizar el registro en la pantalla del ordenador e imprimirlo (Fig. 3.4).



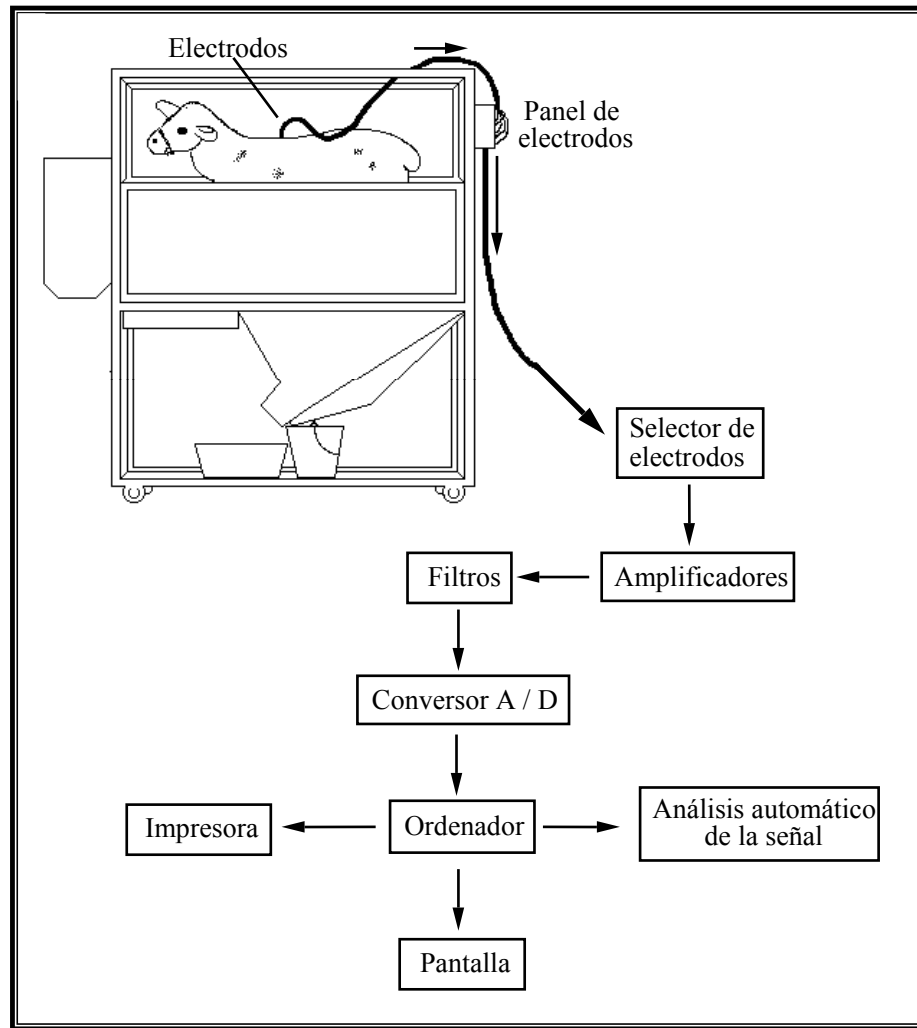


Figura 3.4. - Esquema de la jaula metabólica donde se mantenían las ovejas y del tratamiento de la señal electromiográfica.

### 3.2.4 ANÁLISIS DE LA SEÑAL ELECTROMIOGRÁFICA

El procesamiento de la información electromiográfica se realizó mediante el programa de software Acqknowledge v3.8. Se analizó la frecuencia del complejo mioeléctrico migratorio (MMC) determinando la duración en minutos de cada MMC (periodo) tomando como inicio de cada ciclo el comienzo de la fase III.

Para analizar la motilidad gastrointestinal se realizaba una estimación de la carga mioeléctrica total (integral) de las espigas en un periodo de tiempo determinado. Para cada tramo estudiado, el ordenador sumaba todas las diferencias de potencial (positivas y negativas) en valor absoluto de un tramo seleccionado y expresaba el valor medio en mV/s, ya que se ha comprobado que es un parámetro altamente estable en periodo control (Plaza y cols., 1996c). La amplitud del registro electromiográfico depende del número de células musculares que sean rodeadas por los electrodos. Por ello, los resultados en mV/s obtenidos de un tramo gastrointestinal no son comparables entre varios animales. Para analizar los parámetros de las distintas fases del MMC en periodo control, se hallaba la media de los

valores de actividad mioeléctrica integrada durante las fases II y se expresaban los datos de las fases I y III como porcentaje relativo a la media del valor de las fases II. El LPS y varios de los agonistas de los receptores EPs inducen un aumento de la frecuencia de las fases III del MMC. En este efecto es difícil de distinguir entre la fase I y II, ya que la actividad mioeléctrica disminuye mucho. Por ello, en estos experimentos se ha unificado la cuantificación de la actividad mioeléctrica durante las fases I y II, denominando a este parámetro “fase I+II”. Así, en cada experimento se analizó un periodo control de 5 horas antes de la administración del agente. En este tiempo se cuantificó la media de los valores de actividad mioeléctrica integrada durante las fases I y II del MMC de forma conjunta, utilizando este valor como dato control. Tras la administración del agente, se analizó la actividad mioeléctrica de la misma manera, pero cuantificando la media de cada periodo de 60 minutos. Esta media se expresó como porcentaje relativo a la media del periodo control de 5 horas.

Con el fin de eliminar las pequeñas oscilaciones de la línea basal que no pueden ser filtradas se le proporcionaba al ordenador un valor de diferencia de potencial basal, por debajo del cual toda señal eléctrica la consideraba como 0 y la despreciaba para todos los cálculos (Fig. 3.5).

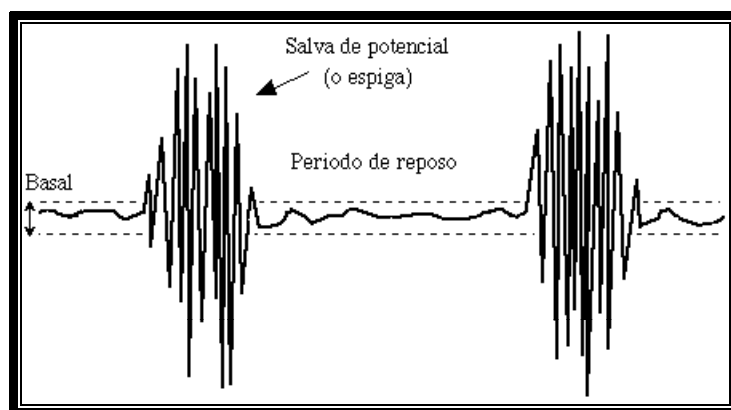


Figura 3.5.- Representación de dos salvas de potencial (o espigas).

### 3.2.5 ADMINISTRACIÓN DE LOS AGENTES

La administración a nivel periférico se realizó por vía iv en la vena yugular a través de un catéter apirógeno Vasocan Braunüle (B/Braun) de Teflón FEP (propileno etileno fluorado), de 1,3 mm de Ø externo y 45 mm de longitud. La cánula era mantenida con heparina disuelta al 0,1% en solución salina estéril y apirógena para evitar la coagulación de la sangre.

La administración a nivel central se realizó a través de la cánula icv de acero implantada en el ventrículo lateral. A través de ella se introducía un catéter de Teflón PTFE (politetrafluoroetileno), de 0,56 mm de Ø interno y 1,07 mm de Ø externo, con el que se atravesaban los 2-4 mm de tejido cerebral que faltaban hasta alcanzar la luz del ventrículo lateral. Antes de la administración icv de un agente y de forma regular a días alternos, se

verificaba que salía líquido cefalorraquídeo a través del catéter, bien de forma espontánea o tras la compresión de las venas yugulares.

### 3.2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se organizaron lotes compuestos por 5 ovejas cada uno. Transcurrida una semana de la intervención quirúrgica comenzaban los registros electromiográficos. En cada experimento se realizaba un periodo de control de 12 horas.

En una primera serie de experimentos se administró LPS por vía iv (0,1 µg/kg).

En la segunda serie de experimentos se administraron iv los inhibidores de macrófagos clorhexahidrato de gadolinio (III) (10 mg/kg) ó tiloxapol (100 mg/kg/h, 1h) 72 ó 4 horas respectivamente antes de la administración de LPS (0,1 µg/kg). En otros experimentos se administraron dos dosis de gadolinio (10 mg/kg) separadas 72 horas y posteriormente LPS (0,1 µg/kg) 72 horas tras la segunda dosis de gadolinio.

En la siguiente serie de experimentos se administraron los agonistas de los receptores EP de la PGE<sub>2</sub>: 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>, 2 y 8 nmol/kg, icv; así como 8 nmol/kg, iv), butaprost (EP<sub>2</sub>, 2 y 8 nmol/kg, icv; así como 8 nmol/kg, iv), sulprostona (EP<sub>3</sub>, 0,4, 2 y 8 nmol/kg, icv; así como 2 nmol/kg, iv) y L-902,688 (EP<sub>4</sub>, 0,4 y 2 nmol/kg, icv; así como 2 nmol/kg, iv).

Para descartar un posible efecto *per se* del solvente, la solución salina y el DMSO fueron ensayados ellos sólo siguiendo el mismo protocolo que las sustancias problema y se utilizaron como control para los análisis estadísticos.

Para cada tratamiento se estableció una secuencia aleatoria para la infusión de las distintas dosis de cada agente en cada animal.

Los experimentos en los que se administraban agentes inductores de fiebre se separaron un mínimo de 7 días entre sí.

### 3.2.7 AGENTES ENSAYADOS

El LPS (E. coli serotipo 0111:B4), clorhexahidrato del gadolinium (III), tiloxapol, y el DMSO eran de Sigma (Madrid). La solución salina estéril y apirógena era de Braun (Barcelona).

El gadolinio y el tiloxapol se diluyeron el mismo día de su utilización en 2 y 500 ml de solución salina estéril respectivamente. El LPS se disolvía en agua destilada estéril a 0,1 mg/ml, se alicuotaba y se mantenía congelado a -20 °C hasta su utilización, en la que se disolvía en 2 ml de solución salina estéril.

La sulprostona era de Tocris Bioscience (Reino Unido). El butaprost, 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> y el L-902,688 eran de Cayman Chemical (USA).

La sulprostona y el butaprost venían disueltos comercialmente en metilacetato, mientras que el 17-fenil trinor y el L-902,688 venían disueltos en etanol. Todos fueron desecados mediante una corriente de nitrógeno. Posteriormente, los agonistas de los receptores EP eran disueltos en DMSO puro, se alicuotaban y se mantenían congelados a -20 °C hasta su utilización.

### 3.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA y WESTERN BLOTTING

Para llevar a cabo los estudios de inmunohistoquímica (IHC) y *western blotting* (WB) se utilizaron tres lotes de tres ovejas, previamente desparasitadas como se indica en el apartado 3.1. Cada lote se componía de una oveja que actuaba como control y recibía una inyección iv de 2 ml de solución salina (solvente del LPS), y dos ovejas a las que se les administraba una inyección iv de LPS (0,1 µg/kg). Transcurrida 1 hora de la inyección, se procedía al sacrificio de la oveja control y una de las que recibían LPS. La tercera oveja se sacrificaba transcurridas 4 horas de la administración del LPS. Los tiempos de sacrificio (1 y 4 horas) se eligieron debido a que los animales estaban alcanzando o habían alcanzado el primer y el segundo pico de la respuesta febril al LPS, respectivamente.

El sacrificio de los animales se realizaba mediante una sobredosis iv de pentobarbital sódico (Dolethal, Vétoquinol, Madrid). De forma inmediata se realizaba una incisión en la cavidad abdominal para proceder a la extracción del aparato digestivo y se recogían fragmentos del saco dorsal del rumen, antro abomasal y duodeno (previa eliminación del mesenterio y de la grasa), hígado y pulmón. En algunos fragmentos de duodeno procedimos a obtener muestras de mucosa separada de las capas de músculo liso. Para ello realizábamos un raspado de la capa mucosa con ayuda de un portaobjetos.

También se extraía el cerebro y se tomaban muestras de hipotálamo y tronco del encéfalo (bulbo raquídeo). Todos los tejidos eran lavados con tampón salino fosfato (PBS) frío (Tabla 3.1).

PBS, pH 7,2	
NaCl	137 mM
KCl	2,68 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,14 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76 mM

Tabla 3.1.- Composición del tampón salino fosfato (PBS).

Una vez extraídas las muestras destinadas a IHC, eran fijadas en una solución de formol al 10%, con pH 7 (Tabla 3.2), donde permanecieron 24 horas.

<b>Solución fijadora de formol, pH = 7</b>	
Formaldehído comercial 37-38%	10%
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	25,6 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	45,8 mM

Tabla 3.2.- Composición del formol utilizado para fijar los tejidos.

Las muestras destinadas a WB eran congeladas mediante la inmersión en isopentano (Fluka, Madrid) mantenido a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Transcurridos unos minutos, se extraía el tejido y se almacenaba a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que tenía lugar su homogeneización.

### 3.4 ESTUDIOS DE WESTERN BLOTTING (WB)

La técnica de *western blotting* (WB) o *immunoblotting* es una técnica basada en principios inmunológicos para detectar y cuantificar antígenos proteicos.

El equipo empleado para el WB (sistema de WB en minigeles) se adquirió a la casa Biorad (Hercules, CA, EE.UU.). El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), la albúmina sérica bovina (BSA), el IGEPAL CA-630, el desoxicolato sódico, el dodecil sulfato de sodio (SDS) y el persulfato de amonio (APS) procedían de Sigma (Madrid). La tetrametiletilenodiamina (TEMED), el Tween 20, el Azul de bromofenol y el colorante Ponceau S fueron adquiridos a Acros Organics (New Jersey, EE.UU.). La acrilamida/bisacrilamida y el glicerol fueron adquiridos a AppliChem (Alemania), mientras que el colorante de Bradford fue adquirido a Biorad. El 1,4- ditiotreitol (DTT), el tris base y la glicina fueron suministrados por Roche Diagnostics (Barcelona). El resto de reactivos para el WB, así como para los tampones, se adquirieron a Panreac (Barcelona), salvo que se indique lo contrario. Los anticuerpos primarios frente a los receptores de la PGE<sub>2</sub> (EPs) y frente a la COX-1 así como el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano fueron adquiridos a Cayman Chemical (USA). El anticuerpo primario anti-COX-2 y el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano fueron adquiridos a BD Biosciences (Bélgica). El anticuerpo frente a la actina, y el secundario anti-cabra acoplado a peroxidasa de rábano, se adquirieron a Santa Cruz (California, EE.UU.). Los anticuerpos se alicuotaban y se mantenían, según las instrucciones de la casa comercial, a  $4^{\circ}\text{C}$  o a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 3.4.1 HOMOGENEIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Ayudándonos de un mortero de porcelana preenfriado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , las muestras congeladas se fragmentaban en pequeños trozos. Los fragmentos de tejido obtenidos se introducían en tubos de ensayo que contenían 1 ml por cada 100 gramos de tejido de un tampón de

homogeneización RIPA (IGEPAL CA-630 1%, desoxicolato de sodio 0,5%, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% en PBS, pH 7,2), suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas comercial (Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche, Alemania), y los inhibidores de proteasas fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) (Roche, Alemania), a una concentración final de 0,1 mM, bestatina y pepstatina A (Sigma, Madrid) a una concentración final de 5 µg/ml y aprotinina (Sigma, Madrid) a una concentración final de 4.2 µg/ml.

Se realizaba un homogenado mediante la aplicación de varios pases con un homogeneizador tipo Ultraturrax (Yellow Line DI 25 Basic) a 9500 rpm, manteniendo el tubo en hielo para evitar la activación de las proteasas por el calentamiento del homogenado. Una vez que las soluciones tenían un aspecto homogéneo se sometían a una sonicación, que consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular. La intensa agitación producida destruye las membranas celulares. En nuestro caso, la muestra se sometió a 15 impulsos de sonicación de 1 segundo de duración a 60 W de potencia (Bandelin, Berlín, Alemania), manteniendo en todo momento el tejido en frío. Posteriormente, las muestras se centrifugaban a 10000 g a 4 °C durante 10 minutos y se recogía el sobrenadante obtenido. Se procedía a cuantificar las proteínas totales mediante el método de Bradford y posteriormente los sobrenadantes se almacenaban en viales tipo Eppendorf a –80 °C hasta su análisis.

### 3.4.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la cuantificación de las proteínas de los tejidos homogeneizados se utilizó el método de Bradford (1976). Se trata de un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. Para ello, a la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a su concentración, mientras se cumpla la ley de Lambert-Beer. Tras estas reacciones la intensidad de color producida puede ser medida con la ayuda de un espectrofotómetro.

El método de Bradford está basado en el cambio de color que se produce cuando el azul brillante de Comassie G250 en solución ácida, se une a las proteínas. La forma protonada del colorante azul Comassie tiene un color rojo-naranja pálido. El colorante se une fuertemente a las proteínas, interactúa con los grupos hidrofóbicos y los cargados positivamente, de manera que en aquellas zonas de las proteínas donde se encuentran los residuos cargados positivamente, el colorante azul Comassie se desprotoniza, produciendo un color azul intenso.

La relación existente entre la absorbancia y la concentración de proteínas se establece experimentalmente mediante el análisis de distintas concentraciones conocidas y crecientes de una proteína de referencia, en nuestro caso la albúmina sérica bovina (BSA), a las que se les aplica el mismo método analítico de forma paralela a la muestras problema. De esta manera se obtiene una recta patrón, mezclando la BSA, agua miliQ y el colorante de Bradford (Tabla 3.3).

Recta patrón							Tubos muestra	
BSA (1 mg/ml) (μl)	0	2	5	10	15	20	Muestra (μl)	10
Agua miliQ (μl)	50	48	45	40	35	30	Agua miliQ (μl)	990
Bradford (ml)	1	1	1	1	1	1	Bradford (ml)	1

Tabla 3.3. - Preparación de la recta patrón y de las muestras para cuantificar las proteínas mediante el método de Bradford.

Tras la adición del colorante, los tubos se agitaban, se dejaban en reposo durante 5 minutos y se medía la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

### 3.4.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez determinada la concentración de proteínas totales, se calculaba la dilución a realizar para cargar en cada pocillo de gel los μg de proteína adecuados (Tabla 3.4). Para realizar la dilución se utilizó un tampón de carga (glicerol 30%, SDS 0,35 mM, DTT 0,60 mM, azul de bromofenol 0,012% en Tris-Cl 4% SDS pH 6,8) que contenía un agente reductor (DTT) para destruir los dímeros de proteínas.

	Carga de proteínas totales de la muestra (μg)						
	Rumen	Antro	Duodeno	Hipotálamo	Bulbo raquídeo	Hígado	Pulmón
EP <sub>1</sub>	25	25	25	25	25	---	---
EP <sub>2</sub>	25	25	25	25	25	---	---
EP <sub>3</sub>	25	25	25	25	25	---	---
EP <sub>4</sub>	25	25	25	25	25	---	---
COX-1	---	---	---	75	90	25	25
COX-2	---	---	---	75	90	25	25

Tabla 3.4. - Carga total de proteínas utilizada.

El volumen final de la muestra cargada era igual a la capacidad máxima de cada pocillo: 20 μl en geles de 0,75 mm de grosor y 40 μl en geles de 1,5 mm de grosor. Una vez que las muestras para cargar en los geles habían sido preparadas, se sometían a ebullición en viales de tipo Eppendorf durante 3 minutos, se introducían inmediatamente después en hielo, y se centrifugaban brevemente a 7000 rpm para recuperar el agua de condensación de la tapa del vial. Posteriormente, eran congeladas a -80 °C hasta su utilización.

### 3.4.4 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS COX Y LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs)

El primer paso del protocolo comienza realizando una separación de proteínas por su tamaño molecular mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida que contiene dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

Se preparaba un gel concentrador (*stacker*), que era situado en la parte superior, y un gel separador, situado en la parte inferior, mezclando las soluciones en el orden que se indica en la Tabla 3.5. La concentración de acrilamida para el gel separador fue del 10% tanto para las COX como para los receptores de la PGE<sub>2</sub>, cuyos tamaños moleculares previstos son: 70 y 72 kDa para COX-1 y COX-2 respectivamente; y 56, 67, 62 y 64 kDa para los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> respectivamente.

Una vez preparada la mezcla, se introducía el gel separador con la ayuda de una pipeta Pasteur entre dos cristales mantenidos sobre unos soportes. La separación entre estos dos cristales determina el espesor final de los geles (0,75 ó 1,5 mm). Se rellenaba el hueco hasta alcanzar la altura deseada y se añadía una pequeña cantidad de SDS al 0,1% para privar del contacto con el oxígeno y favorecer así la reacción de polimerización.

	<b>Gel separador (10%)</b> <i>(x2 en geles de 1,5 mm)</i>	<b>Gel concentrador</b> <i>(x2 en geles de 1,5 mm)</i>
Agua destilada	4,02 ml	4,24 ml
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2,50 ml	---
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	---	1,90 ml
Acrilamida/Bisacrilamida al 30%	3,33 ml	1,25 ml
SDS al 20%	0,05 ml	0,04 ml
APS al 0,1%	0,10 ml	0,07 ml
TEMED	0,015 ml	0,015 ml

Tabla 3.5. - Composición de los geles separador y concentrador.

Una vez polimerizado el gel separador, se extraía el SDS con papel de filtro y se introducía entre los cristales la solución del gel concentrador. Para poder realizar pocillos en el gel concentrador para cargar las muestras, se colocaban unos peines en la parte superior de los cristales. Cuando tenía lugar la polimerización del gel concentrador se extraían con cuidado los peines y los cristales se colocaban en la cubeta de electroforesis, que se llenaba con el tampón de electroforesis preparado cada día partiendo de una solución madre concentrada 10 veces, a la que se añadía SDS al 0,1% (Tabla 3.6).

Las muestras y un marcador de peso molecular coloreado (Biorad) se cargaban en cada pocillo del gel con ayuda de una micropipeta.

	<b>Tampón de electroforesis (10x)</b>	<b>Tampón de <i>electroblotting</i></b>
Glicina (mM)	1,92	192
Tris base (mM)	0,25	25
Metanol (%)	---	20

Tabla 3.6. - Tampones de electroforesis y de *electroblotting* empleados en el WB.



La cubeta de electroforesis con los geles en su interior se conectaba a una corriente eléctrica, con intensidad constante a 20 mA (10 mA por gel) hasta que las muestras estaban compactadas en el borde del gel separador, momento en el que la intensidad se cambiaba a 30 mA. Las muestras en los geles se dejaban correr durante 1-2 horas.

Una vez hecha la electroforesis, se realizaba la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (Millipore, MA, EE.UU.) o *electroblotting*. Es muy importante que el gel y la membrana estén dispuestos correctamente para evitar perder las proteínas en el tampón, pues éstas migran hacia el polo positivo, donde se colocaba la membrana de PVDF. Se introducían los soportes en la cubeta de transferencia, se añadía el tampón de *electroblotting* (Tabla 3.6) y se conectaba la cubeta a una fuente de corriente eléctrica, a intensidad constante de 200 mA (100 mA por gel) durante 2 horas. Tras la transferencia, las membranas se lavaban 10 minutos con el tampón de lavado PBST o TBST, dependiendo del caso. Para la COX-1 se ha utilizado el PBST, mientras que para los receptores de la PGE<sub>2</sub> y la COX-2 se ha empleado el TBST. El PBST y el TBST consistían en PBS o TBS respectivamente, a los que se les adicionaba Tween 20 hasta un 0,1% final (Tabla 3.7).

PBS, pH 7,2		TBS, pH 7,5	
NaCl	137 mM	Tris	65,2 mM
KCl	2,68 mM	NaCl	150,6 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,14 mM		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76 mM		

Tabla 3.7. - Composición del tampón salino fosfato (PBS) y del tampón tris salino (TBS).

Las membranas se teñían durante 5 minutos con el colorante de Ponceau (Ponceau S 0,5%, ácido acético glacial 1% en agua Milli-Q) para comprobar que la transferencia había tenido lugar correctamente y para obtener una aproximación de la carga total de proteínas en cada una de las calles. Las membranas se sumergían en agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

Tras un lavado de 10 min con PBST o TBST, las membranas se bloqueaban durante 1 hora a t<sup>a</sup> ambiente incubándolas con una solución que contenía leche en polvo desnatada. Las proteínas de la leche ocupan los espacios huecos de la membrana, evitándose así la unión no específica del anticuerpo primario en ella. Los tampones de bloqueo eran los siguientes:

- PBST + 5% de leche en polvo desnatada (COX-1)
- TBST + 5% de leche en polvo desnatada (COX-2)
- TBST + 10% de leche en polvo desnatada (EPs)

Tras el bloqueo, las membranas se lavaban durante 10 minutos con PBST o TBST y se incubaban durante toda la noche a 4°C en agitación suave con el anticuerpo primario disuelto en:

- PBST + 1% de leche en polvo desnatada (COX-1)
- TBST + 1% de leche en polvo desnatada (COX-2)
- TBST + 5% de leche en polvo desnatada (EPs)

En la Tabla 3.8 se indica la parte de la proteína (epítipo) utilizada para la obtención de los anticuerpos primarios, así como las características de cada uno de ellos.

Ac	Tipo	Origen del Ac	Origen de la proteína inmunogénica	Epítipo	Dilución	Casa comercial y referencia
EP <sub>1</sub>	Pc	Conejo	Humano	C-t	1:500 (GI); 1:10.000 (H, BR)	CC (101740)
EP <sub>2</sub>	Pc	Conejo	Humano	C-t	1:1.000 (GI); 1:10.000 (H, BR)	CC (101750)
EP <sub>3</sub>	Pc	Conejo	Humano	C-t	1:1.000 (GI); 1:10.000 (H, BR)	CC (101760)
EP <sub>4</sub>	Pc	Conejo	Humano	C-t	1:1.000 (GI); 1:10.000 (H, BR)	CC (101775)
COX-1	Mc	Ratón	Oveja	---	1:1.000	CC (160110)
COX-2	Mc	Ratón	Rata	---	1:1.000	BD (610204)
$\beta$ -actina	Pc	Cabra	Humano	C-t	1:20.000	SC (sc-1615)
GAPDH	Pc	Conejo	Humano	---	1:10.000	SC (sc-25778)
2 <sup>ario</sup> anti conejo	---	Cabra	---	---	1:5.000	CC (10004301)
2 <sup>ario</sup> anti ratón	---	Cabra	---	---	1:1.000	BD (554002)
2 <sup>ario</sup> anti cabra	---	Burro	---	---	1:5.000	SC (sc-2313)

Tabla 3.8. - Anticuerpos utilizados en los estudios de *western blotting*. Ac: anticuerpo. Mc: monoclonal. Pc: policlonal. C-t: extremo carboxi-terminal. GI: gastrointestinal. H: hipotálamo. BR: bulbo raquídeo. CC: Cayman Chemical. BD: BD Biosciences. SC: Santa Cruz Laboratories.

El anticuerpo anti-COX-1 reconocía a la COX-1 ovina, según aseguraba la propia casa comercial, hecho que además se comprobó en los experimentos de WB utilizando como control positivo un estándar de electroforesis consistente en una disolución de la proteína COX-1 ovina purificada (Ref. 360100, Cayman Chemical, Ann Arbor MI, EE.UU.).

En estudios preliminares se ensayó por WB el anticuerpo monoclonal frente a la COX-2 empleado en los estudios de IHC (Castro, 2010). Como control positivo de la COX-2 se utilizó un estándar de electroforesis de la COX-2 ovina purificada (Ref. 360120, Cayman Chemical).

Los anticuerpos primarios anti-EPs ya habían sido validados previamente para WB de tejidos de oveja (Schmitz y cols., 2006).

Como control positivo en la técnica de WB, se utilizó un homogenado de riñón de oveja (15 µg de proteína total), puesto que los receptores EPs han sido ampliamente determinados en dicho tejido (Watabe y cols., 1993; Breyer y cols., 1993; Breyer y cols., 1996; Breyer and Breyer, 2000; Williams y cols. 2004). Para comprobar la especificidad del anticuerpo secundario se omitieron los anticuerpos primarios anti-EPs.

Como control positivo del anticuerpo anti-EP<sub>3</sub>, se utilizó su péptido de bloqueo (Cayman Chemical, 301760). Para ello procedimos a incubar el anticuerpo primario con el péptido de bloqueo mencionado en un ratio de 1:10, durante 1 hora a t<sup>a</sup> ambiente en agitación. Posteriormente la membrana, tras ser bloqueada, se incubaba con esta disolución siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se sometían a 5 lavados con el tampón correspondiente (PBST o TBST), uno de 15 minutos y cuatro de 5 minutos.

Posteriormente se realizaba la incubación con un anticuerpo secundario durante 1 hora a t<sup>a</sup> ambiente disuelto en:

- PBST + 1% de leche en polvo desnatada, diluido 1:1000 (COX-1)
- TBST + 1% de leche desnatada en polvo, diluido 1:2000 (COX-2)
- TBST + 1% de leche desnatada en polvo, diluido 1:5000 (EPs)

Tras la incubación con el anticuerpo secundario se sometía a las membranas a un lavado de 15 minutos y cuatro de 5 minutos con el tampón correspondiente (PBST o TBST).

Las membranas se incubaban con una solución de quimioluminiscencia (ECL Plus, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante 5 minutos y se revelaban en un cuarto oscuro, poniéndolas en contacto con películas fotográficas (Kodak Biomax Light Film, Sigma, Madrid o Agfa, Madrid) y posteriormente sumergiéndolas en un líquido revelador (Tabla 3.9) y en un fijador (Agfa), procedimiento por el cual se obtenían unas señales en forma de bandas, para su posterior análisis.

<b>Revelador de películas fotográficas</b>	
Ecol	11,6 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> anhidro	0,76 M
Hidroxiquinona	81,7 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> anhidro	0,45 M
KBr	42 mM

Tabla 3.9. - Composición del líquido revelador de películas fotográficas.

### 3.4.5 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE $\beta$ -ACTINA Y GAPDH

Para averiguar si los posibles cambios en la expresión de nuestras proteínas eran debidos al tratamiento con LPS o por el contrario se debían a que la cantidad de muestra cargada en las distintas calles del gel no era la misma, mediante la técnica de WB se determinó la cantidad de  $\beta$ -actina (en el sistema nervioso central, hígado y pulmón) y de GAPDH (en los demás órganos). Estas dos proteínas se utilizaron como controles de carga puesto que se sabe que su expresión no se ve alterada por la acción del LPS. La  $\beta$ -actina es una proteína de 46 kDa presente en los tejidos en gran cantidad. El GAPDH, de 36 kDa, es una de las enzimas clave involucrada en la glicolisis.

Con el objetivo de volver a incubar las membranas con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina o anti-GAPDH y evitar señales erróneas, las membranas se ponían en contacto con un medio que provocaba la separación de los anticuerpos primario y secundario unidos a la muestra (*stripping*). Para ello, las membranas se mantenían durante 30 minutos en una solución de glicina (200 mM) con 0,4% de SDS, a pH 2,5. Tras dos lavados de 15 minutos con PBST (determinación de  $\beta$ -actina) o TBST (determinación de GAPDH), se incubaban durante 1 hora a t<sup>a</sup> ambiente con PBST o TBST, con un 5% de leche desnatada en polvo.

Las membranas se lavaban durante 10 minutos con PBST o TBST y eran incubadas toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti- $\beta$ -actina hecho en cabra (Santa Cruz) o con el anti-GAPDH hecho en conejo (Santa Cruz), disueltos respectivamente a 1:20.000 en PBST o 1:10.000 en TBST, en ambos casos con un 1% de leche desnatada en polvo. Tras un lavado de 15 minutos y cuatro de 5 minutos con PBST o TBST, se incubaban con un anticuerpo secundario anti-IgGs de cabra (Santa Cruz) en el caso de  $\beta$ -actina, o bien con un anticuerpo secundario anti-IgGs de conejo (Santa Cruz) en el caso del GAPDH, disueltos 1:5.000 en el mismo medio que los anticuerpos primarios, durante 1 hora a t<sup>a</sup> ambiente. Tras un lavado de 15 minutos y cuatro de 5 minutos con PBST o TBST, las membranas se incubaban con el reactivo de quimioluminiscencia y se revelaban como se ha indicado anteriormente.

### 3.4.6 ANÁLISIS DE LAS BANDAS OBTENIDAS POR WB

Las películas fotográficas se escanearon a una resolución de 300 puntos por pulgada y se guardaron como archivos de imagen en formato tif. La intensidad de las bandas se determinó mediante el programa informático Quantity One Analysis Software (Biorad).

La cuantificación de las bandas se normalizaba teniendo en cuenta la señal de  $\beta$ -actina o de GAPDH obtenida para cada una de ellas.

### 3.5 ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

Esta técnica fue utilizada para estudiar la localización en los tejidos de las ciclooxigenasas (COX) y de los receptores de la PGE<sub>2</sub> (EPs). Los productos utilizados se adquirieron a Panreac (Barcelona), salvo que se indique lo contrario.

Las muestras fueron procesadas en un inclusor que sustituía el agua de los tejidos por parafina, formando un bloque. En el caso de las muestras de hipotálamo, se realizaron tres secciones: una primera a nivel del **área preóptica**, otra por detrás del **quiasma óptico** (zona de los núcleos paraventricular y anterior) y una última sección justo por delante del **cuerpo mamilar** (zona de los núcleos dorso y ventromedial).

A partir de los bloques de parafina se realizaban cortes de 4 µm de espesor con un microtomo. Los cortes se introducían en un baño de agua destilada a 37 °C para reblandecer la parafina, y se recogían con portaobjetos cargados positivamente (Starfrost, Knittel Glaser, Burgdorf, Alemania) que atraen fuertemente los tejidos que se colocan sobre ellos, de manera que se puedan someter a los diversos tratamientos sin riesgo de desprendimiento. Los portaobjetos se introducían en posición vertical en una estufa a 37 °C un mínimo de 24 horas para su completo secado, tras lo cual se almacenaban a temperatura ambiente.

El mismo día del experimento, los cortes se desparafinaban y rehidrataban introduciéndolos sucesivamente en unas cubetas con un producto sustitutivo del xilol llamado Histo-Clear II (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA) y alcoholes a distintas concentraciones durante el tiempo y en el orden que se indica en la Tabla 3.10. Una vez rehidratados se dejaban reposar 5 minutos en PBS.

Producto	Tiempo (min.)
Histo-Clear	10
Histo-Clear	10
Etanol 100%	5
Etanol 100%	5
Etanol 96%	5
Etanol 90%	5
Etanol 70%	5
Agua destilada	5

Tabla 3.10. - Secuenciación y tiempos de inmersión de los portaobjetos en Histo-Clear, alcoholes y agua.

A continuación, el siguiente paso consistía en inhibir la peroxidasa endógena de los tejidos, para lo cual los portaobjetos se sumergían durante 30 minutos en una solución de metanol con un 0,3% de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Transcurrido este tiempo se dejaban reposar durante 5 minutos en PBS.

La siguiente etapa del protocolo consistía en realizar el denominado “desenmascaramiento del antígeno” (*antigen retrieval*) dado que la fijación en formaldehído podía provocar cambios en la conformación de las proteínas que podrían impedir el correcto reconocimiento de éstas por parte de los anticuerpos. Para ello se calentaban los tejidos, sumergidos en una disolución de 1,8 mM de ácido cítrico y 8,2 mM de citrato de sodio dihidratado, en un horno microondas realizando dos pases de 5 minutos a 750 W de potencia. Una vez realizado este proceso se dejaban reposar 5 minutos en PBS.

Para minimizar la cantidad utilizada de anticuerpos y soluciones, se rodeaban los cortes con una barrera hidrofóbica mediante un marcador ImmEdge (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). De esta manera, las disoluciones hidrófilas no podían entrar en contacto con dicha barrera y se mantenían dentro del espacio limitado por dicho marcador.

Con el objetivo de bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos, los cortes se incubaban durante 1 hora con suero normal de la especie en la que se obtuvo el anticuerpo secundario. Existen algunas diferencias en el protocolo utilizado según los anticuerpos:

- Para los anticuerpos primarios anti-EPs, el suero (Ref. S-2000, Vector Laboratories) se disolvía al 20% en PBS.
- Para los anticuerpos primarios anti-COX-1 y anti-COX-2 se seguían las instrucciones de dilución del kit Vectastain ABC para anticuerpos primarios hechos en ratón (PK-4002, Vector Laboratories).
- Para los marcadores de macrófagos perivasculares CD163/ED2 y de macrófagos pulmonares VPM32 se seguían las instrucciones de dilución del kit Vectastain ABC Universal (PK-6200, Vector Laboratories).

Posteriormente, el suero se decantaba y el corte se incubaba con la solución del anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4 °C. En la Tabla 3.11 se indican el tipo de anticuerpo utilizado (mono o policlonal), la especie animal de la que se obtuvo, el origen de la proteína inmunogénica, la dilución empleada y la casa comercial de la que se adquirió cada uno de ellos. Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS con suero normal y Triton X-100 al 1%.

Ac	Tipo	Origen del Ac	Origen de la proteína inmunogénica	Dilución	Casa comercial
EP <sub>1</sub>	Pc	Conejo	Humano	1:3.000	CC (101740)
EP <sub>2</sub>	Pc	Conejo	Humano	1:6.000 (GI); 1:3.000 (H, BR)	CC (101750)
EP <sub>3</sub>	Pc	Conejo	Humano	1:6.000 (GI); 1:3.000 (H, BR)	CC (101760)
EP <sub>4</sub>	Pc	Conejo	Humano	1:3.000	CC (101775)
COX-1	Mc	Ratón	Oveja	1:50 (BR); 1:100 (H); 1:200 (Híg, P)	CC (160110)
COX-2	Mc	Ratón	Rata	1:25 (H, BR); 1:200 (Híg, P)	BD (610204)
COX-2	Mc	Conejo	Rata	Listo para uso	Master Diagnóstica (MAD-000335QD-3)
VPM32	Mc	Ratón	Oveja	1:10	Lab. Dr. NJ Watt *
CD163/ED2	Pc	Conejo	Humano	1:500	Abgent (AP7330a)
2 <sup>ario</sup> anti conejo	---	---	---	Instrucciones del kit.	Vectastain ABC kit Elite PK-6200 Universal.
2 <sup>ario</sup> anti ratón	---	---	---	Instrucciones del kit.	Vectastain ABC Peroxidase Mouse IgG PK-4002.

Tabla 3.11. - Anticuerpos utilizados en los estudios de IHC. Ac: anticuerpo. 2<sup>ario</sup>: Secundario. Pc: policlonal. Mc: monoclonal. GI: gastrointestinal. H: hipotálamo. Híg: hígado BR: bulbo raquídeo. CC: Cayman Chemical. BD: BD Biosciences. \*: Anticuerpo procedente del laboratorio del Dr. NJ Watt (Department of Veterinary Pathology, Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, UK).

Todos los anticuerpos primarios utilizados en IHC reconocieron en el WB a la proteína ovina correspondiente. Además, para comprobar la especificidad de todos los anticuerpos utilizados en la IHC se realizaron experimentos de control negativo. Para ello, los cortes se incubaban durante toda la noche a 4 °C omitiendo el anticuerpo primario.

Al día siguiente, en todos los cortes, independientemente de si se les había añadido o no el anticuerpo primario, se decantaba la solución de incubación y se hacían 3 lavados de 5 minutos en PBS en agitación constante.

Posteriormente, los tejidos se dejaban en contacto con una solución con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (EPs) o anti-ratón (COX-1, COX-2), siguiendo las instrucciones de los kits respectivos (Tabla 3.11). La unión específica del anticuerpo secundario biotinilado con el anticuerpo primario introducía moléculas de biotina en la zona donde se encontraba el antígeno buscado.

Tras 3 lavados de 5 minutos en PBS, se incubaban los cortes, durante 1 hora con el reactivo ABC (Avidin Biotinylated enzyme Complex) contenido en los kits y evitando el contacto con la luz. Este complejo se unía al anticuerpo secundario, gracias a la gran afinidad entre las biotinas de éste y la avidina del complejo ABC. Tras este paso se realizaban 3 lavados de 5 minutos con PBS en agitación.

El siguiente paso consistía en la adición de la diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories), sustrato de la enzima peroxidasa del complejo ABC, lo que provocaba una reacción de oxidación que teñía de marrón las zonas donde se encontraba el complejo ABC. La solución se preparaba inmediatamente antes de su uso siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se ponía en contacto con las muestras y la intensidad de la reacción se controlaba mediante su visualización al microscopio. Transcurrido el tiempo suficiente, los portaobjetos se lavaban con agua destilada durante 5 minutos y posteriormente se dejaban en PBS otros 5 minutos. Para obtener un buen contraste, los tejidos se teñían con hematoxilina de Carazzi durante 5 minutos, lavándose posteriormente en agua destilada otros 5 minutos.

Una vez teñidas las preparaciones, los portaobjetos se deshidrataban mediante el pasaje de los mismos por soluciones de alcohol de graduación creciente terminando en el Histo-Clear, en secuencia contraria a lo indicado en la Tabla 3.10. Después se pasaban por el Histo-Clear y se montaban colocando un cubreobjetos sobre los cortes utilizando como medio de montaje la resina sintética DPX. Transcurridos unos días se tomaban fotografías con una cámara fotográfica (Nikon Digital Sight) acoplada a un microscopio óptico (Nikon Eclipse E200) a través del software Nis Elements F 3.0 (Nikon).

### 3.5.1 DOBLE INMUNOHISTOQUÍMICA

Para determinar si uno de los tipos celulares con inmunorreactividad frente a COX-1 y COX-2 se trataba de macrófagos, recurrimos a la técnica del **dobles inmunomarcaje**, utilizando para ello el marcador de macrófagos perivascuales CD163/ED2 en hipotálamo, bulbo raquídeo e hígado o el marcador de macrófagos ovinos VPM32 en pulmón. Para la visualización de ambos antígenos recurrimos al empleo de la técnica del ABC, pero el revelado se basó en un cromógeno distinto en cada caso.

Inicialmente, se realizó una primera IHC utilizando el anticuerpo anti-CD163 o VPM32. Se siguieron los pasos descritos en el apartado anterior, hasta el revelado con la DAB. Posteriormente, los portaobjetos no se montaron sino que, seguidamente, se procedió a realizar un bloqueo de la actividad avidina. Este paso evitaba las posibles uniones libres que le queden a la avidina conjugada con el enzima revelador del complejo ABC. Para ello, los cortes se incubaron con una solución de biotina al 0,01% (Sigma, Madrid) en PBS con 0,3% de Triton X-100 durante 30 minutos.



Tras esto, se realizaban 3 lavados de 5 minutos en agitación con PBS. Seguidamente, los cortes se incubaban con el anticuerpo primario frente a la COX-1 o COX-2. Tras finalizar esta incubación, las secciones fueron lavadas en agitación 3 veces durante 2 minutos con un tampón fosfato (PB, 0,01M pH 6,8).

Posteriormente, los portaobjetos se incubaron durante 10 minutos en una solución de trabajo compuesta por dicloruro de benzidina (BDHC) 0,01% (Sigma) y nitroprusiato sódico 0,025% (Sigma). La función del BDHC es la de colorante y es similar a la DAB. El nitroprusiato sódico libera óxido nítrico, el cual participa en la reacción. Transcurrido este tiempo de incubación se adicionaba  $H_2O_2$  al 0,016%, lo que constituye el sustrato de la peroxidasa, y se visualizaban los inmunocomplejos. El producto de esta reacción se visualiza con un color gris azulado y cristalino. Tanto el color como la forma del producto, se distinguen fácilmente del color rojizo-marrón procedente de la reacción con la DAB.

Para finalizar, las secciones fueron lavadas 3 veces durante 2 minutos con tampón PB y se procedió al montaje de las mismas, tal y como se ha explicado anteriormente.

Para llevar a cabo la identificación del tipo de células que expresaban la COX-1 en el pulmón, recurrimos al uso de cortes consecutivos en lugar de realizar la codetección de ambos antígenos sobre un mismo corte histológico. Esto es debido a que los anticuerpos disponibles, tanto el anti-COX-1 como el VPM32, habían sido obtenidos en ratón lo que impedía hacer la colocalización.

### 3.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para estudiar la electromiografía durante las fases del MMC control, los datos de actividad mioeléctrica integrada de cada fase del MMC se expresaron como porcentaje con respecto a la media obtenida durante las fases II. Tras la administración de un agente, se cuantificó la media de la actividad mioeléctrica integrada en cada periodo de 60 minutos excluyendo del análisis las fases III. Estos valores se expresaron como porcentaje relativo a la media del periodo control de 5 horas, en el cual se tomó de forma conjunta la actividad de las fases I y II del MMC. Finalmente se calculó la media  $\pm$  el error estándar de cada periodo analizado en los animales utilizados.

Los datos de temperatura corporal se tomaron cada 20 segundos y se expresaron como la diferencia con la media del periodo control.

Para comparar el efecto de los tratamientos en la temperatura corporal y la actividad mioeléctrica integrada, se tomó la media de los datos obtenidos entre los minutos 60 y 180 tras la administración del agente. Los datos de frecuencia de MMC se refieren a la media de todo el efecto del agente.

Para simplificar la presentación de los resultados, salvo que se indique lo contrario, los datos de actividad mioeléctrica integrada corresponden a los grupos de electrodos situados en el saco dorsal del rumen, antro abomasal a 5 cm del píloro, duodeno a 50 cm del píloro y yeyuno a 2 m del ligamento de Treitz. En los estudios de WB, cada dato procedente de la cuantificación se expresó en porcentaje con respecto a los animales control.

Los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) y posteriormente se analizaron las diferencias entre los distintos periodos o tratamientos con un test de Scheffé, considerándose estadísticamente significativas las diferencias cuando el nivel de significación (p) era menor a 0,05. En las tablas y gráficas, el nivel de significación se ha representado con los siguientes símbolos: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$  (con respecto a la administración de solución salina) y † $P < 0,05$ , ‡ $P < 0,01$  y § $P < 0,001$  (con respecto a la inyección de LPS en ausencia de gadolinio, tiloxapol o del antagonista EP correspondiente).

Salvo que se indique lo contrario, en los estudios *in vivo*, los resultados se expresan para un tamaño de muestra de 5 animales. Para los estudios de IHC y WB se utilizaron 3 animales por tratamiento. Para el WB, se repitieron las determinaciones en cada muestra un mínimo de 3 veces. Para la IHC, se realizaron 3 cortes de cada una de las muestras.

## **4.- RESULTADOS**



#### **4.1 EFECTO DEL CLORHEXAHIDRATO DE GADOLINIO (III) Y DEL TILOXAPOL SOBRE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR EL LPS**

##### **4.1.1 MOTILIDAD GASTROINTESTINAL (GI) DE LA OVEJA EN PERIODO CONTROL**

La actividad mioeléctrica del intestino delgado se estructura en ciclos denominados complejos mioeléctricos migratorios (MMC), que se repetían aproximadamente cada 2 horas y no se interrumpían por la ingestión de alimento. Cada MMC está compuesto de tres fases. La fase I (o fase de inactividad), que es un periodo de unos 10-15 minutos en los cuales no se producía ninguna salva de potencial. Le seguía la fase II (o fase de actividad irregular), en la cual aparecían salvas de potencial de manera aleatoria sobre algunas ondas lentas. Esta fase ocupaba la mayor parte del MMC (unas 2 horas) y era seguida por la fase III (o fase de actividad regular), que es la más característica del MMC. Esta se iniciaba en el duodeno y consistía en un periodo de unos 3 minutos durante los cuales se desencadenaban salvas de potencial sobre todas las ondas lentas, aumentando la actividad integrada entre un 200-300 % con respecto a la fase II. Esta fase III (y por tanto todo el MMC) migraba en sentido caudal por todo el duodeno y el yeyuno a una velocidad de 50-60 cm/min. Tras ella aparecía una nueva fase I y comenzaba un nuevo ciclo.

La actividad mioeléctrica del antro abomasal presentaba salvas de potencial en la mayoría de las ondas lentas, con una frecuencia de 6-9 contracciones/minuto. No obstante este patrón motor fluctuaba al mismo ritmo que el MMC intestinal, ya que mientras se observaban las fase III y I en el duodeno, la actividad mioeléctrica del antro gástrico disminuía un 50-60 %.

La temperatura intraperitoneal no se modificó de forma significativa durante los periodos control, siendo la media de  $38,78 \pm 0,07$  °C.

##### **4.1.2 EFECTOS DEL LPS SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL Y LA MOTILIDAD GI EN LA OVEJA**

La administración intravenosa (iv) de 0,1 µg/kg de LPS de *E. coli* producía un aumento de la  $t^a$  corporal que se iniciaba hacia los 45 minutos de la inyección y permanecía elevada durante 5-7 horas. El desarrollo de la fiebre seguía una curva bifásica (Fig. 4.1.2.1), con dos picos, uno de aproximadamente 1 °C a los 60-90 minutos del LPS y otro de 1,5-2,5 °C hacia las 4 horas de la inyección.

Simultáneamente al inicio del aumento de la temperatura corporal se originaba un frente de actividad duodenal que migraba por el yeyuno como la fase III del MMC. Posteriormente, durante 5-6 horas permanecía aumentada la frecuencia del MMC (Fig. 4.1.2). Durante este tiempo, disminuyó la actividad mioeléctrica del antro así como la actividad de las fases II intestinales (Fig. 4.1.2.2).

Durante el tiempo en el que la  $t^a$  corporal estaba aumentando, tanto en la primera fase como en la segunda, los animales experimentaban temblores y taquipnea. Además, mientras la  $t^a$  permanecía elevada, las ovejas presentaban las pupilas contraídas y permanecían en un estado de somnolencia con las orejas caídas. Era muy notorio el hecho de que no ingerían alimento y presentaban polidipsia.

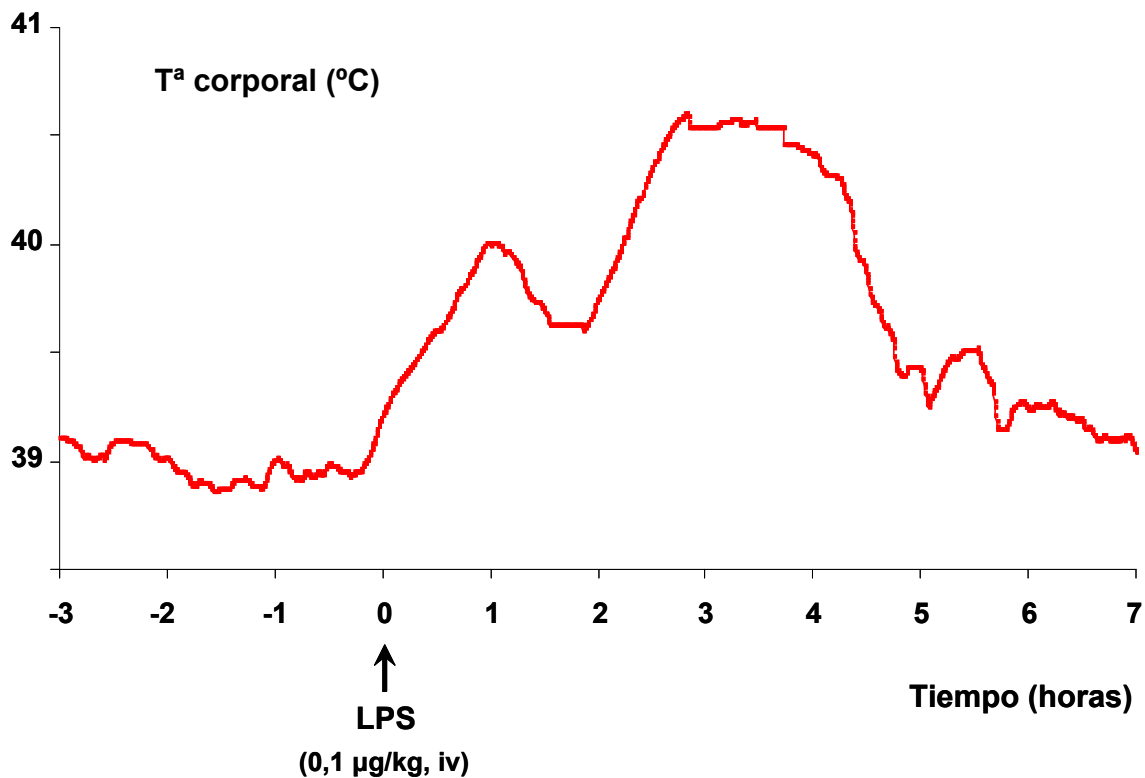


Figura 4.1.2.1 - Efecto de la administración intravenosa (iv) de LPS (0,1  $\mu$ g/kg) sobre la  $t^a$  corporal en la oveja, mostrando el aumento bifásico en la  $t^a$ . Efectos similares se observaron en todos los animales ensayados.

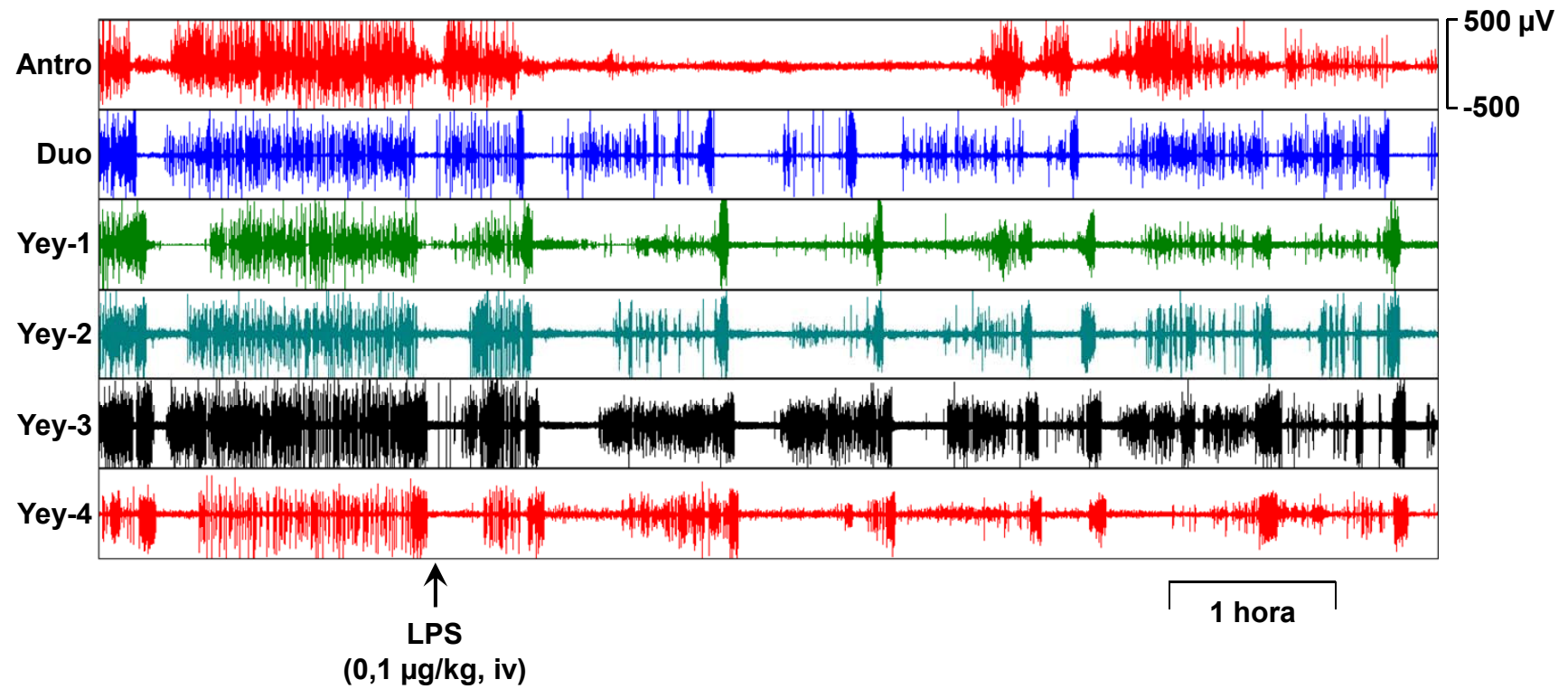


Figura 4.1.2.2 - Registro de la actividad mioeléctrica gastrointestinal en la oveja mostrando el efecto de la administración intravenosa (iv) de LPS. Efectos similares se observaron en todos los animales ensayados. En el antro y duodeno, los electrodos se implantaron a -5 y a 50 cm del píloro. En el yeyuno, se implantaron a intervalos de 1 metro desde el ligamento de Treitz.

#### **4.1.3 EFECTO DEL CLORHEXAHIDRATO DE GADOLINIO (III) Y DEL TILOXAPOL SOBRE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR EL LPS**

Previamente al LPS, se administraron dos productos conocidos por su acción como inhibidores de macrófagos como son el clorhexahidrato de gadolinio (III) y el tiloxapol.

La administración iv de 10 mg/kg de clorhexahidrato de gadolinio (III) producía unos efectos sobre la temperatura y la motilidad GI similares a los descritos anteriormente para el LPS. Al igual que la endotoxina, el gadolinio inducía un aumento de la  $t^a$  corporal que se iniciaba a los 45 minutos de la inyección, pero permanecía elevada durante más tiempo (10-12 horas) que con el LPS. El desarrollo de la fiebre también seguía una curva bifásica, con dos picos, uno de aproximadamente 1 °C a los 60-120 minutos del LPS y otro de 1.6 °C hacia las 6 horas de la inyección, éste último mucho más retrasado que el inducido por el LPS. La administración de gadolinio iniciaba la alteración de la motilidad gastrointestinal a la 1,5 h, una hora más tarde que el LPS. Provocaba la aparición de un frente de actividad duodenal que se propagaba al yeyuno, quedando aumentada la frecuencia de fases III durante 5-6 horas. Durante este tiempo, disminuyó la actividad mioeléctrica del antro así como la actividad de las fases II intestinales.

La administración de gadolinio, 72 horas antes de la inyección del LPS (0.1 µg/kg, iv), no modificó ninguno de los efectos inducidos por la endotoxina sobre la temperatura o la motilidad GI. La administración de dos dosis de gadolinio separadas 36 horas tampoco modificaba los efectos del LPS, administrado 72 horas tras la segunda dosis de gadolinio.

También se ensayó el tiloxapol, un agente que desensibiliza los receptores de macrófagos encargados del reconocimiento de endotoxinas. Cuando se administró iv en infusión continua durante 1 hora a 100 mg/kg/h, no produjo ningún efecto *per se* en la temperatura corporal o la motilidad GI.

Al contrario que el gadolinio, cuando se administró LPS (0.1 µg/kg, iv) 3 horas más tarde de una perfusión con tiloxapol iv (100 mg/kg/h, 1 h), este agente disminuyó significativamente la hipertermia provocada por el LPS y bloqueó totalmente la inhibición de la actividad mioeléctrica integrada en el rumen, antro e intestino. También



disminuyó significativamente el aumento en la frecuencia de las fases III inducido por el LPS (Figura 4.1.3.1, Tabla 4.1.3.1).

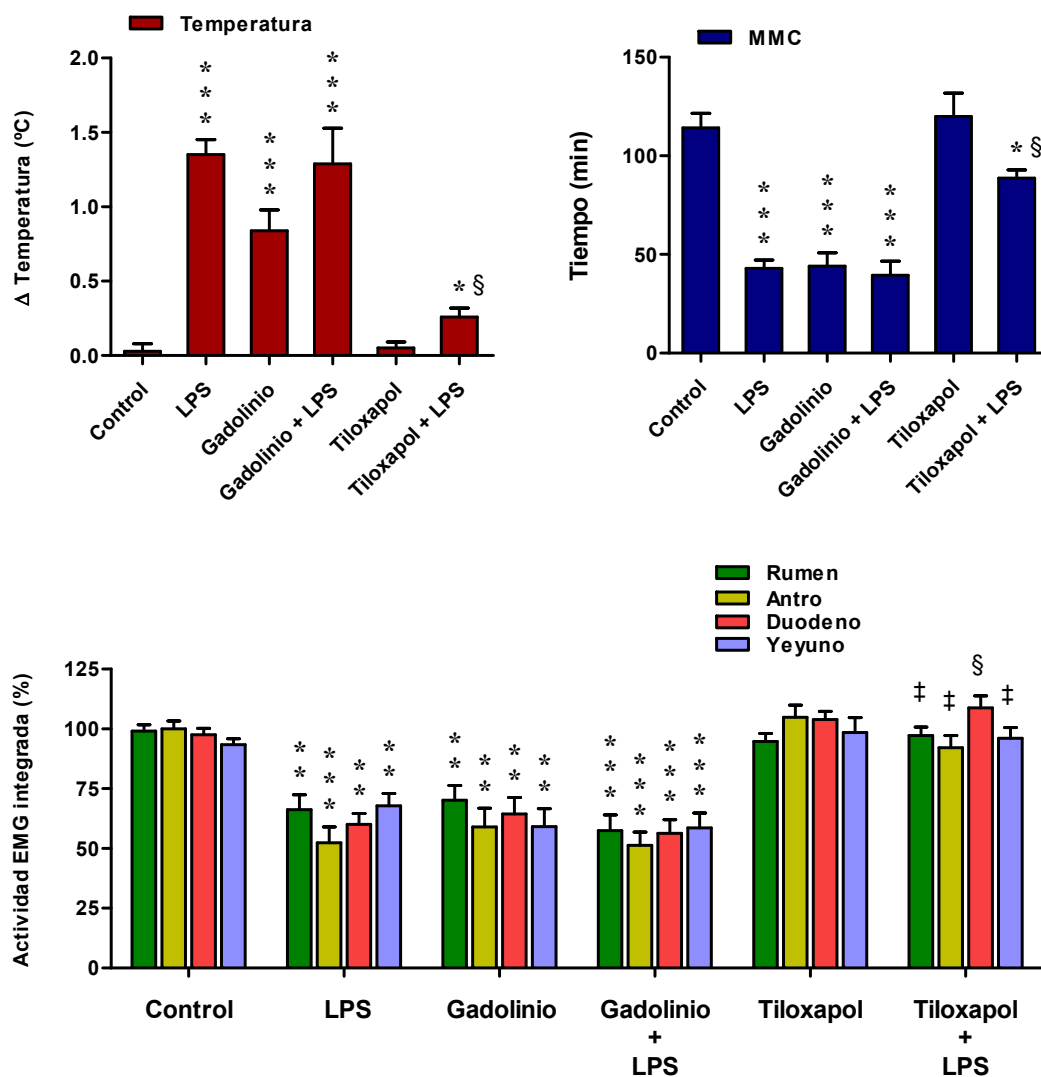


Figura 4.1.3.1 - Efecto de la administración iv de gadolinio y tiloxapol sobre los efectos inducidos por el LPS en la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  y \*\*\*  $P < 0,001$  sobre el control (administración del solvente). ‡  $P < 0,01$  y §  $P < 0,001$  sobre el efecto inducido por el LPS

	<b>LPS</b> (0,1 µ/kg, iv)	<b>Gadolinio</b> (10 mg/kg, iv)	<b>Gadolinio</b> (10 mg/kg, iv) + <b>LPS</b> (0,1 µ/kg, iv)	<b>Tiloxapol</b> (100 mg/kg, iv) + <b>LPS</b> (0,1 µ/kg, iv)
$\Delta T^a$ 1 <sup>er</sup> pico (°C)	1,31 ± 0,11 ***	1,04 ± 0,14 ***	0,96 ± 0,10 ***	0,36 ± 0,11 * ‡
$\Delta T^a$ 2 <sup>o</sup> pico (°C)	2,03 ± 0,11 ***	2,50 ± 0,23 ***	1,90 ± 0,15 ***	0,52 ± 0,06 *** §
Inicio $\Delta T^a$ (min)	46,80 ± 4,21	44,20 ± 5,21	37,60 ± 5,85	63,40 ± 8,04
Duración $\Delta T^a$ (h)	6,73 ± 0,96	785,40 ± 65,85	5,26 ± 0,91	2,85 ± 0,31
Inicio en antro (min)	43,00 ± 9,20	98,60 ± 18,17	49,60 ± 2,42	----
Duración antro (h)	292,80 ± 30,89	395,80 ± 81,89	352,40 ± 79,22	----
1 <sup>a</sup> fase III (min)	42,20 ± 11,09	98,40 ± 24,19	47,80 ± 2,35	68,60 ± 13,71
Duración fase III (h)	296,00 ± 45,37	285,20 ± 14,43	219,40 ± 31,94	161,40 ± 20,10

Tabla 4.1.3.1 – Efecto de la administración iv de gadolinio y tiloxapol sobre los efectos inducidos por el LPS en la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. \* P<0,05 y \*\*\* P<0,001 sobre el control (administración del solvente). ‡ P<0,01 y § P<0,001 sobre el efecto inducido por el LPS.

#### 4.2 EXPRESIÓN DE LA COX-1 Y LA COX-2 EN EL HIPOTÁLAMO Y BULBO RAQUÍDEO DE LA OVEJA

Se realizaron estudios de western blotting (WB) e inmunohistoquímica (IHC) para detectar la expresión y localización de la COX-1 y la COX-2 en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja. Los experimentos se realizaron con anticuerpos (Acs)

monoclonales hechos en ratón frente a la COX-1 de oveja (Ref. 160110, Cayman Chemical) y la COX-2 de rata (Ref. 610204, BD Biosciences).

Los dos Acs empleados en este estudio reconocieron en el WB dos controles positivos comerciales, consistentes en preparaciones de COX-1 y COX-2 ovina desnaturalizadas, y en cuyas calles revelaron la presencia de bandas de 70 y 72 kDa, respectivamente, tamaños previstos para estas proteínas ovinas (Figs. 4.5.1 y 4.2.3). Además, para analizar la especificidad de la tinción en la IHC, se realizaron experimentos incubando cortes histológicos consecutivos con y sin el Ac primario. A diferencia de los cortes incubados con los Acs primarios, en los controles negativos no se observó tinción específica frente a las COX (Fig. 4.2.1).

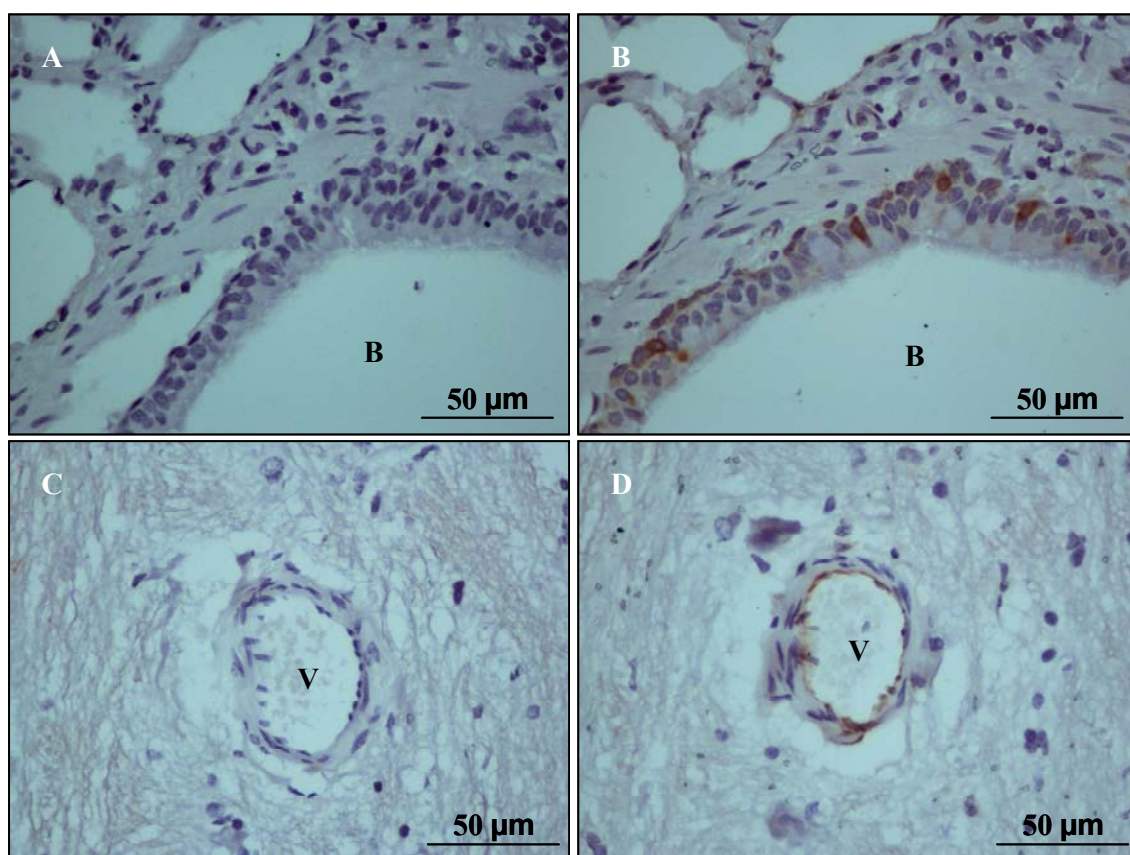


Figura 4.2.1 - Cortes consecutivos de pulmón (A y B) y bulbo raquídeo (C y D) de oveja incubados con los anticuerpos primarios frente a la COX-1 (B) y la COX-2 (D), o sin ellos (A y C respectivamente) para comprobar la especificidad de los mismos. B: bronquio. V: vaso sanguíneo.

Mediante la técnica de WB, se determinó la expresión de COX-1 y COX-2 en homogenados de hipotálamo y bulbo raquídeo de ovejas control. Las bandas obtenidas tenían el mismo tamaño previsto para las COX de oveja y aparecieron a la misma altura que las bandas de los controles positivos comerciales anteriormente mencionados (Figs. 4.2.2 y 4.2.3. Tablas 4.2.1 y 4.2.2).

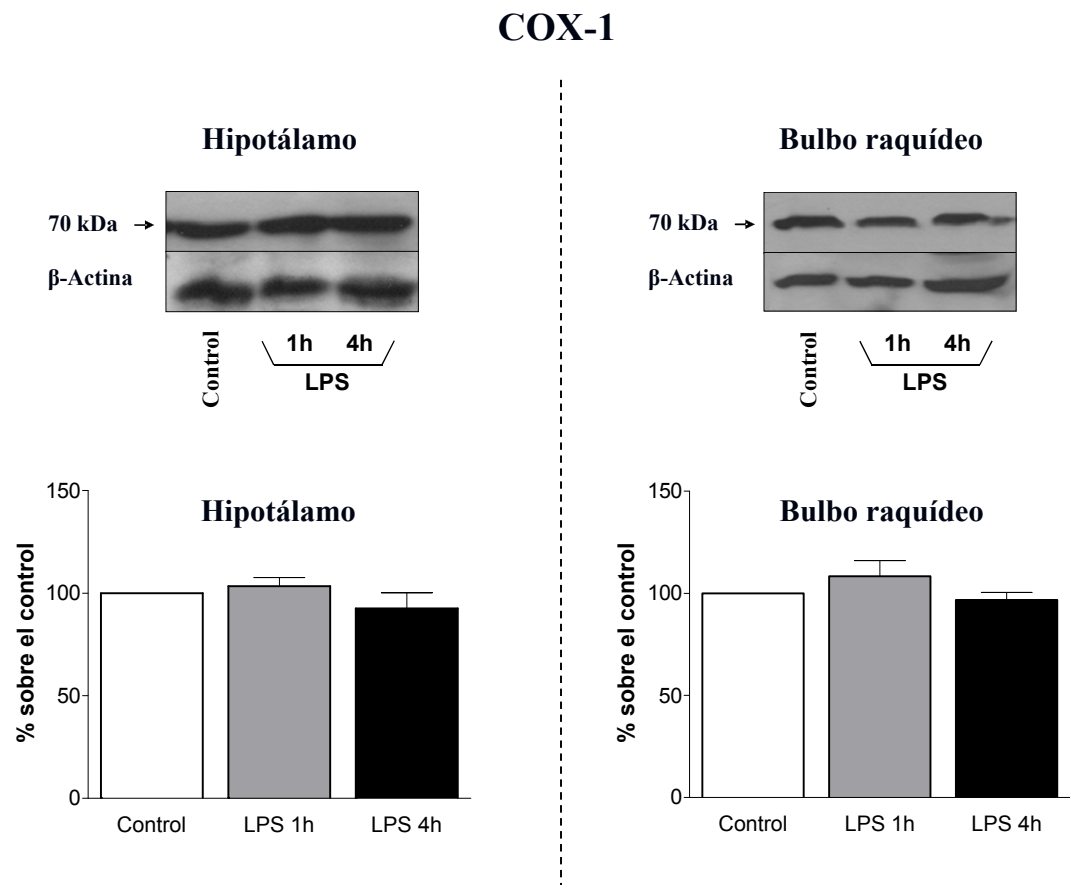


Figura 4.2.2 - Expresión de la COX-1 en homogenados de hipotálamo y bulbo raquídeo de ovejas control o tratadas con LPS durante 1 ó 4 horas. El WB mostró una banda de 70 kDa. La β-actina se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.

	COX-1	
	Hipotálamo	Bulbo raquídeo
Control	100 %	100 %
LPS 1h	103,36 ± 4,21 %	108,32 ± 7,69 %
LPS 4h	92,58 ± 7,68 %	96,75 ± 3,67 %

Tabla 4.2.1 - Efecto del tratamiento con LPS sobre la expresión de la COX-1 en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja. La cuantificación de las bandas de los animales tratados con LPS se expresa como porcentaje respecto de los animales control (100%).

## COX-2

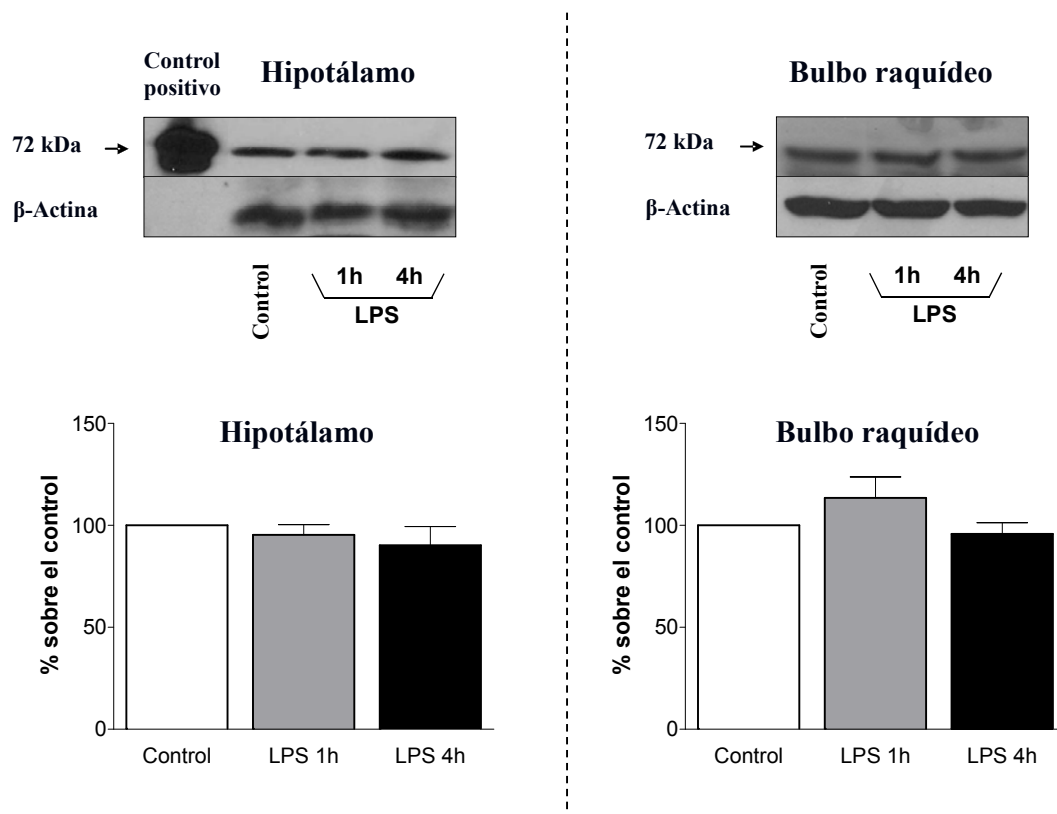


Figura 4.2.3 - Expresión de la COX-2 en homogenados de hipotálamo y bulbo raquídeo de ovejas control o tratadas con LPS durante 1 ó 4 horas. El WB mostró una banda de 72 kDa. La β-actina se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.

	COX-2	
	Hipotálamo	Bulbo raquídeo
Control	100 %	100 %
LPS 1h	95,32 ± 4,97 %	113,37 ± 10,35 %
LPS 4h	90,23 ± 9,17 %	95,78 ± 5,50 %

Tabla 4.2.2 - Efecto del tratamiento con LPS sobre la expresión de la COX-2 en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja. La cuantificación de las bandas de los animales tratados con LPS se expresa como porcentaje respecto de los animales control (100%).

Estudios previos de IHC realizados en nuestro laboratorio con el mismo Ac empleado en este trabajo, ya habían identificado la expresión de la COX-2 en endotelios y neuronas del hipotálamo (Castro, 2010).

En el presente trabajo hemos ampliado el estudio al bulbo raquídeo. En cortes histológicos de hipotálamo y bulbo raquídeo de animales control, mediante la técnica de IHC, se determinó la expresión de las dos COX en **endotelios vasculares** (Fig. 4.2.6 A).

La COX-2 se expresó en ciertas **neuronas** del hipotálamo y del bulbo raquídeo (Fig. 4.2.6 B). En el bulbo raquídeo, las neuronas teñidas estaban dispersas, mientras que en el hipotálamo eran especialmente abundantes en determinadas zonas, como se verá en el apartado 4.4.

Además, la COX-1 también se expresó en unos **gránulos** pequeños presentes en torno a núcleos de células cuyo citoplasma no se observó teñido. Además, se localizó en el citoplasma de unas pequeñas **células redondas** próximas a los vasos sanguíneos, que en algunos casos llegaban a estar localizadas dentro de la propia pared (Fig. 4.2.4 A y B. Fig. 4.2.5 A y B).

<b>Hipotálamo y Bulbo raquídeo</b>	<b>COX-1</b>			<b>COX-2</b>		
	<i>Control</i>	<i>LPS</i>		<i>Control</i>	<i>LPS</i>	
		<i>1 h</i>	<i>4 h</i>		<i>1 h</i>	<i>4 h</i>
<i>Endotelios vasculares</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<i>Neuronas</i>	----	----	----	<b>X</b>	↑	↑↑
<i>Gránulos en torno a núcleos celulares</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	----	----	----
<i>Células redondeadas próximas a vasos sanguíneos</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	----	↑	↑↑
<i>Células redondeadas en el parénquima</i>	----	----	----	----	↑	↑↑

Tabla 4.2.3 - Resumen de la localización de la COX-1 y la COX-2 en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja. X: expresión de la proteína. ↑: aumento en la expresión de la proteína tras el tratamiento con LPS durante 1 h. ↑↑: aumento mayor en la expresión de la proteína tras el tratamiento con LPS durante 4 h.



## COX-1 Hipotálamo

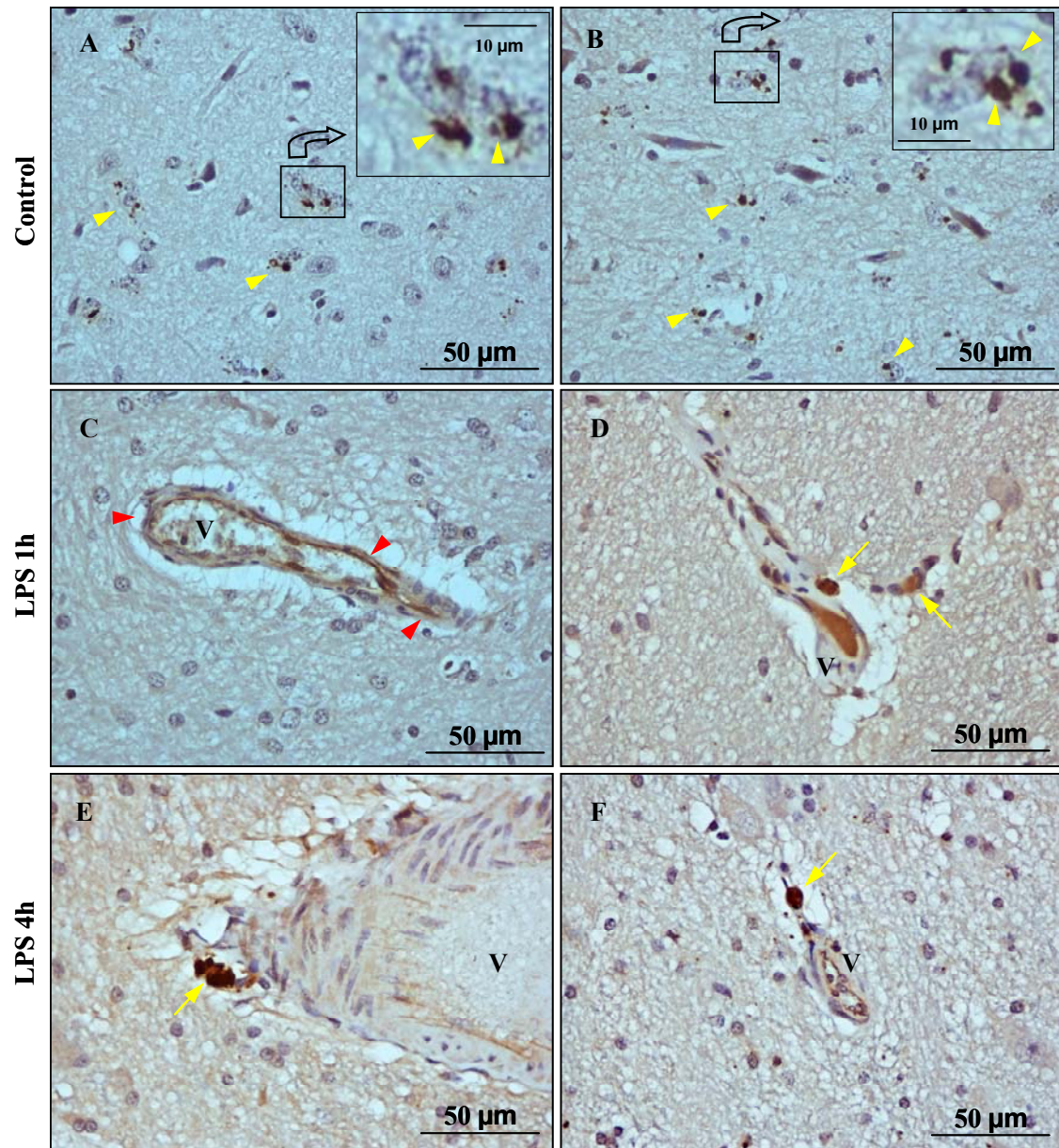


Figura 4.2.4 - Localización de la COX-1 en el hipotálamo de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). El LPS no indujo cambios en la expresión de la COX-1. A y B: Tinción en gránulos relacionados con núcleos celulares (puntas de flechas amarillas). C: Tinción de un endotelio vascular (puntas de flechas rojas). D, E y F: Células redondeadas localizadas cerca de los vasos sanguíneos (flechas amarillas). V: vaso sanguíneo.



## COX-1

## Bulbo raquídeo

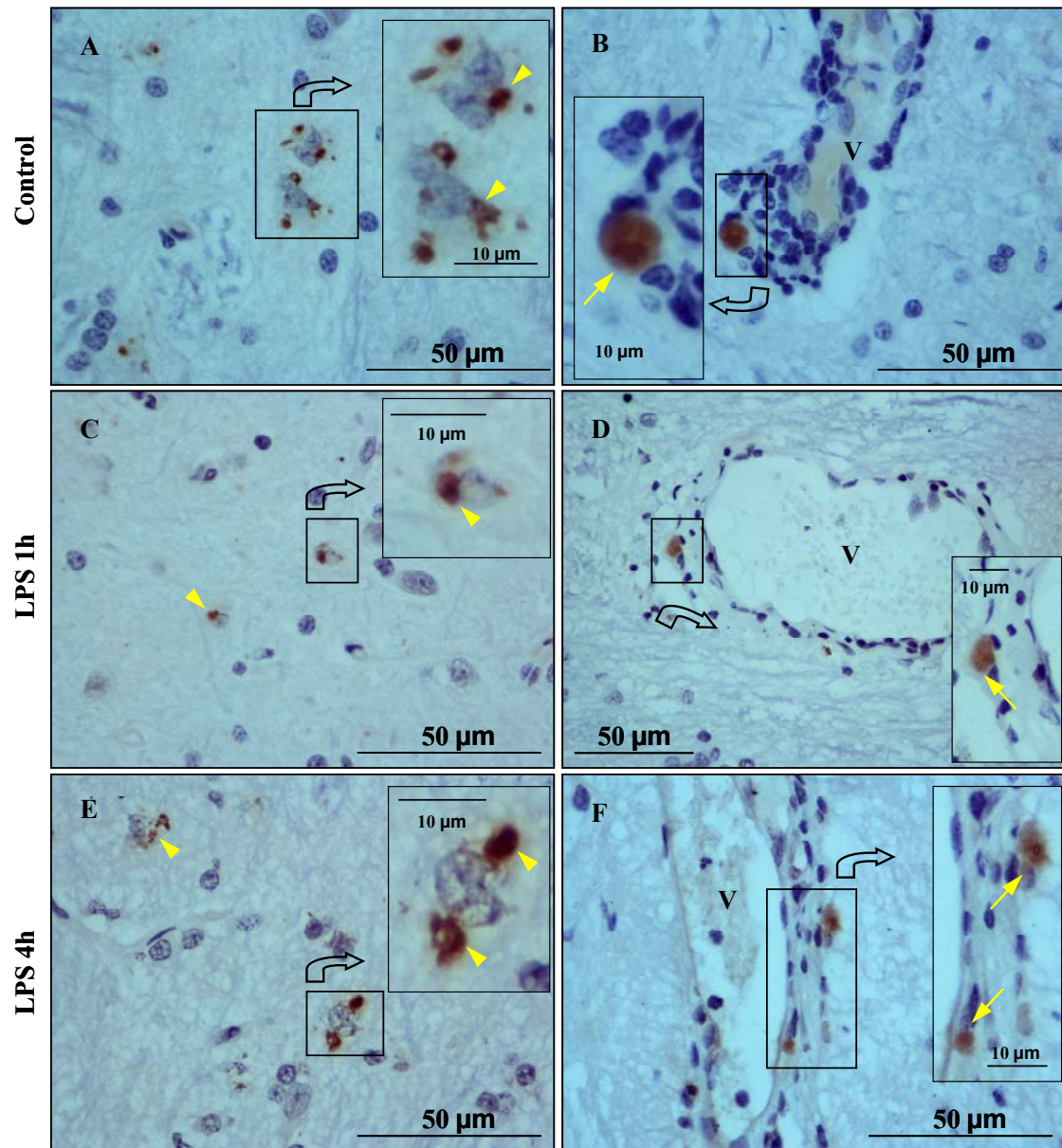


Figura 4.2.5 - Localización de la COX-1 en el bulbo raquídeo de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). El LPS no indujo cambios en la expresión de COX-1. A, C y E: Tinción en gránulos redondeados relacionados con núcleos celulares (puntas de flechas amarillas). B, D y F: Tinción de células redondeadas localizadas cerca de los vasos sanguíneos (flechas amarillas). V: vaso sanguíneo.

## COX-2 Bulbo raquídeo

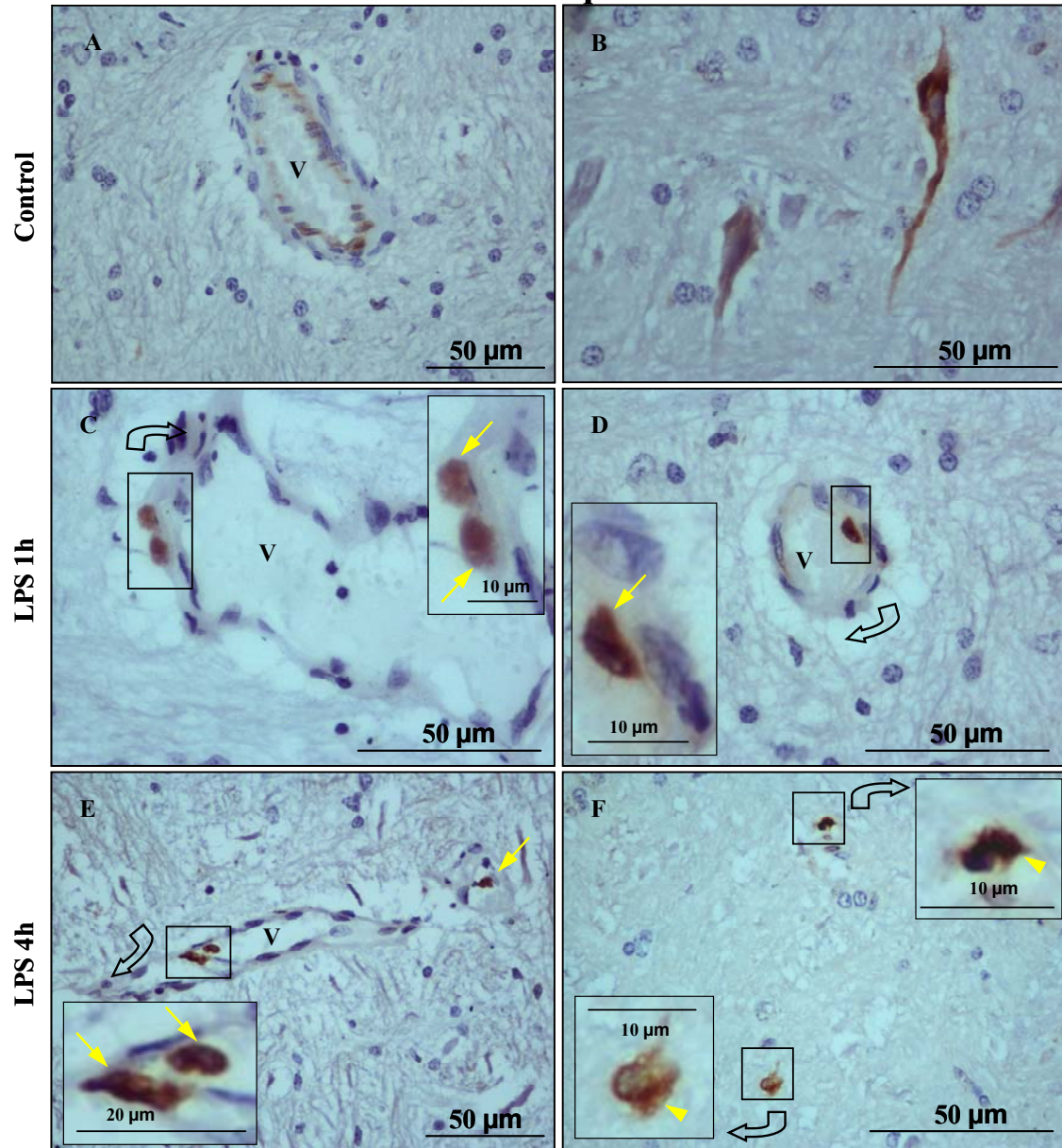


Figura 4.2.6 - Localización de la COX-2 en el bulbo raquídeo de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). A: Tinción de un endotelio vascular. B: Tinción de neuronas. C-F: Tras el tratamiento con LPS, se observa la aparición de células redondeadas con el citoplasma intensamente teñido, cercanas a los vasos sanguíneos o incluidas dentro de la pared vascular (flechas amarillas), así como distribuidas por el parénquima (puntas de flechas amarillas).

### 4.3 EFECTO DEL LPS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA COX-1 Y LA COX-2 EN EL HIPOTÁLAMO Y BULBO RAQUÍDEO DE LA OVEJA

Las técnicas de WB e IHC mostraron que el LPS no modificó la expresión de la COX-1 en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja (Figs. 4.2.2 y 4.2.4, Tablas 4.2.1 y 4.2.5).

Sin embargo, en el caso de la COX-2, mediante la técnica de IHC se observó, tras el tratamiento con LPS durante 1 ó 4 horas, la aparición de unas **pequeñas células redondeadas** con el citoplasma intensamente teñido (Fig. 4.2.6 C-F). Estas células eran muy similares a las descritas para la COX-1 en tejidos control y también estaban localizadas próximas o integradas en la pared de vasos sanguíneos, pero también aparecía este tipo celular repartido por el parénquima. Por el contrario, este aumento en la expresión de COX-2 no se apreció mediante WB (Fig. 4.2.3 y Tabla 4.2.2).

### 4.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE COX EN EL HIPOTÁLAMO Y BULBO RAQUÍDEO DE LA OVEJA

Con la finalidad de determinar la identidad de las células pequeñas redondeadas que expresaban la COX-1 en control y la COX-2 tras el tratamiento con LPS, recurrimos a la técnica de la doble IHC. Esta técnica permite detectar la coexpresión de dos o más proteínas. Ya que los macrófagos son la primera línea de defensa ante estímulos patógenos, quisimos estudiar si las células que expresaban las COX podrían ser macrófagos. Así, valoramos la expresión de las COX junto con el marcador de macrófagos perivascuales CD163/ED2. Los experimentos se realizaron con los mismos anticuerpos frente a la COX-1 y la COX-2 utilizados anteriormente y además un anticuerpo policlonal hecho en conejo frente a la región N-terminal del receptor CD163 humano (Ref. AP7330a, Abgent).

Cuando los cortes histológicos de hipotálamo y bulbo raquídeo de animales control se incubaron con el marcador de macrófagos perivascuales **CD163/ED2**, se observó tinción en unos **gránulos** presentes en torno a núcleos celulares (Fig. 4.4.3 G) similares a los descritos en la Fig. 4.2.4 A y B y Fig. 4.2.5 A, C y E. Además, también se marcaron unas **células redondas** con su citoplasma intensamente teñido, unas próximas a vasos sanguíneos (Fig. 4.4.2 A y D) y otras distribuidas por el parénquima (Fig. 4.4.6 C), también similares a las descritas en la Fig. 4.2.4 D, E y F; Fig. 4.2.5 B, D y F y Fig. 4.2.6 C-F. Posteriormente, estos mismos cortes marcados con el anticuerpo CD163/ED2 también fueron incubados con el anticuerpo anti-COX-1 ó con el anti-COX-2.

En los animales control, los pequeños **gránulos** presentes en torno a núcleos celulares así como las **células redondas** próximas a vasos sanguíneos coexpresaban el marcador CD163/ED2 y la COX-1 (Fig. 4.4.1), sugiriendo que eran células inmunitarias de tipo macrófago. Las células dispersas por el parénquima positivas a CD163/ED2 no coexpresaron COX-1, tal como se observó en la IHC de la COX-1. El tratamiento con LPS no modificó la expresión de los marcadores CD163/ED2 y COX-1.

En animales control no se observó coexpresión de COX-2 en los macrófagos marcados con el CD163/ED2. Sin embargo, el tratamiento con LPS a 1 y 4 horas aumentó el número de las células redondas positivas a CD163/ED2 próximas a vasos sanguíneos y repartidas por el parénquima. Además, el LPS indujo coexpresión de COX-2 en estas células (Fig. 4.4.2 y 4.4.3).

Tras determinar que es la COX-2 la que cambia su expresión en el sistema nervioso central de la oveja tras el tratamiento con LPS, decidimos estudiar en qué núcleos del hipotálamo se modificó dicha expresión.

En los animales control, la COX-2 se localizó en los endotelios vasculares de las secciones hipotalámicas a nivel del **área preóptica**, en la zona de los núcleos **paraventricular** y **anterior**, y en la zona de los núcleos **dorso** y **ventromedial** (Fig. 4.4.4 B, D y F; Fig. 4.4.6 B y Fig. 4.4.7 C). La COX-2 también se expresó en neuronas del **área preóptica medial** y de los núcleos **paraventricular** y **ventromedial** (Fig. 4.4.4 A, C y E; Fig. 4.4.5 B; Fig. 4.4.6 A, D y G, y Fig. 4.4.7 A, D y G).

En **todas** las áreas hipotalámicas, el tratamiento con LPS durante 1 ó 4 horas, provocó un aumento en el número de células positivas al marcador CD163/ED2 y además inducía la coexpresión de la COX-2. Estas células estaban localizadas en relación a vasos sanguíneos y también repartidas por el parénquima (Fig. 4.4.4 D, E y F; Fig. 4.4.5 C-F; Fig. 4.4.6 F, H e I y Fig. 4.4.7 E, F, H e I). Eran especialmente abundantes en la zona del **órgano vasculoso de la lámina terminal** (OVLT) (Fig. 4.4.5) y en el núcleo **preóptico medial**, pero en este último caso sólo en los animales tratados durante 4 h (Fig. 4.4.4).

El LPS no modificó la expresión de la COX-2 en las neuronas del núcleo preóptico. Sin embargo, 1 hora tras el LPS se observó un aumento en el número de neuronas positivas a COX-2 en los núcleos **paraventricular** y **ventromedial**, aumentando todavía más este número a las 4 horas del LPS (Fig. 4.4.6 A, D y G y Fig. 4.4.7 A, D y G).



Además, el tratamiento con LPS indujo la expresión de la COX-2 en unas células grandes con largas prolongaciones citoplasmáticas presentes en todas las zonas estudiadas del hipotálamo. Esta expresión apareció 1 h tras el LPS, mientras que no se detectó a las 4 h de la endotoxina (Fig. 4.4.4 C; Fig. 4.4.6 E y F y Fig. 4.4.7 E).

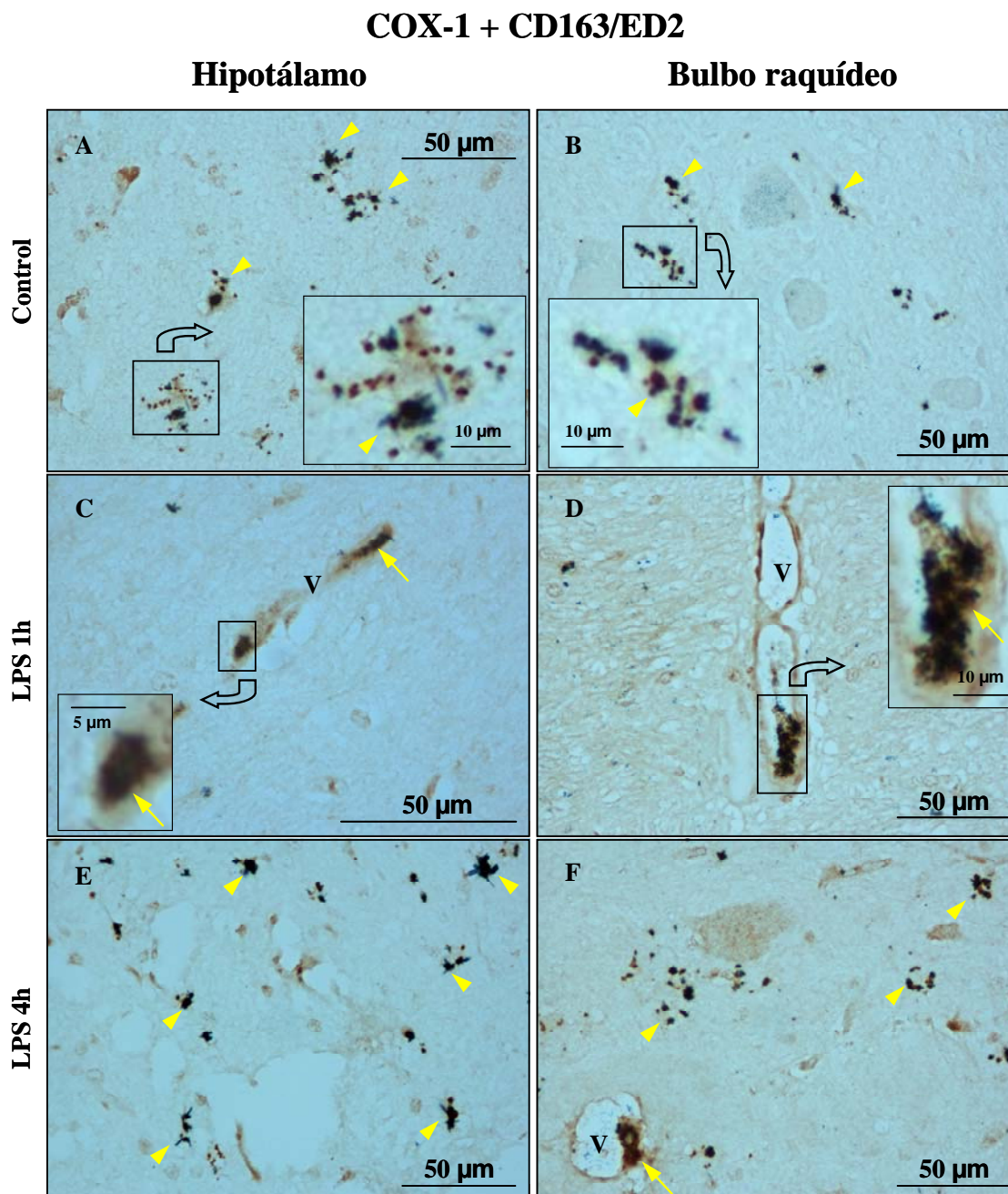


Figura 4.4.1 - Coexpresión de la COX-1 (tinción gris oscuro) y del marcador de macrófagos perivascuales CD163/ED2 (tinción marrón) en el hipotálamo y bulbo raquídeo de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). Como se ha indicado anteriormente, el LPS no modificó el patrón de expresión de COX-1. Gránulos celulares (puntas de flechas amarillas) y células relacionadas con vasos sanguíneos (flechas amarillas) positivas a CD163/ED2 y coexpresando la COX-1. V: vaso sanguíneo.

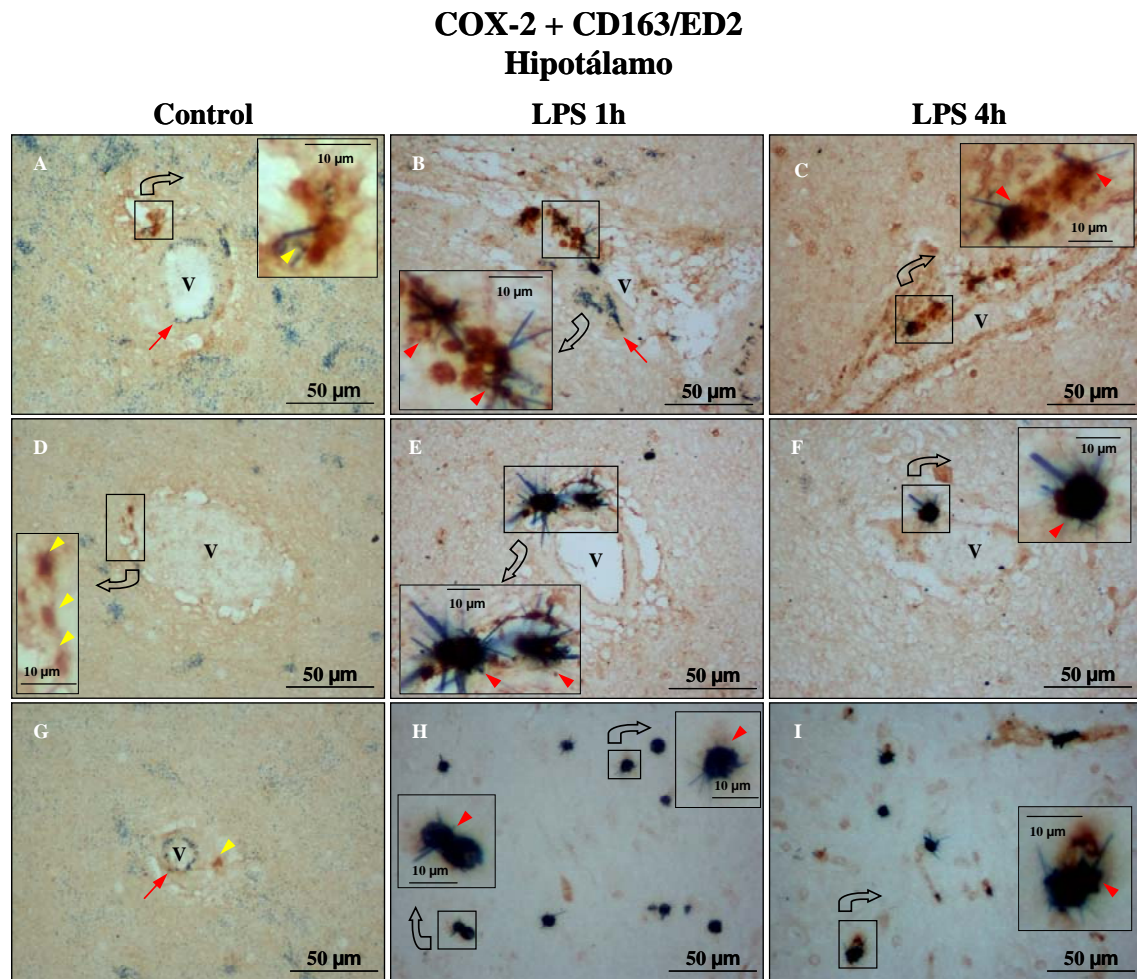


Figura 4.4.2 - Coexpresión de la COX-2 (tinción gris oscuro) y del marcador de macrófagos perivascuales CD163/ED2 (tinción marrón) en el hipotálamo de ovejas control (A, D y G) y tratadas con LPS durante 1 hora (B, E y H) ó 4 horas (C, F e I). Tanto en los animales control como en los tratados con LPS, se observó expresión de COX-2 en endotelios vasculares (flechas rojas). En los animales control se observaron células positivas a CD163/ED2 que no expresaban la COX-2 (puntas de flechas amarillas en A, D y G), localizadas en relación a vasos sanguíneos. En los animales tratados con LPS, se observó una mayor cantidad de estas mismas células, las cuales coexpresaban la COX-2 (puntas de flechas rojas) localizadas en relación a vasos sanguíneos (B, C, E y F) y distribuidas por el parénquima (H e I). V: vaso sanguíneo.

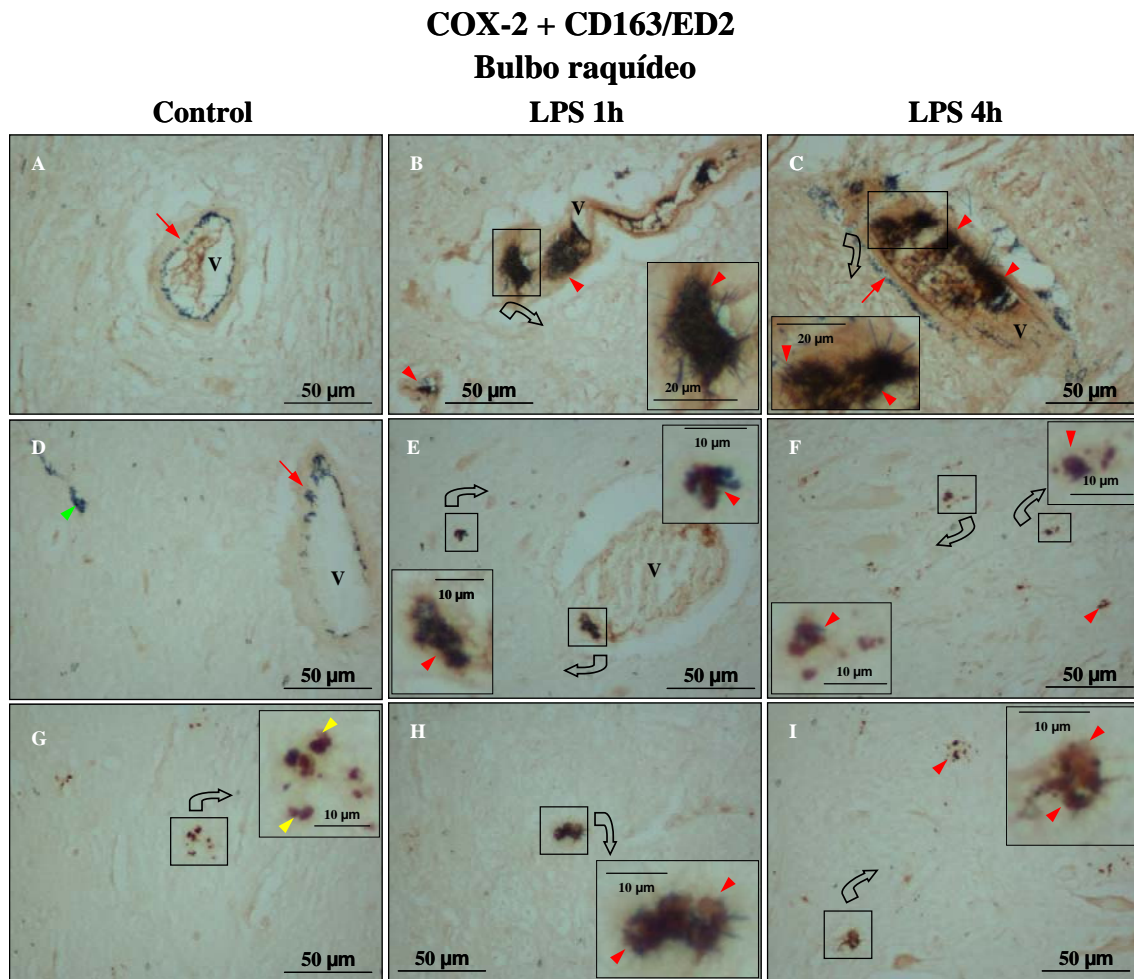


Figura 4.4.3 - Coexpresión de la COX-2 (tinción gris oscuro) y del marcador de macrófagos perivascuales CD163/ED2 (tinción marrón) en el bulbo raquídeo de ovejas control (A, D y G) y tratadas con LPS durante 1 hora (B, E y H) ó 4 horas (C, F e I). En los animales control se observó expresión de COX-2 en endotelios vasculares (flechas rojas en A y D) y algunas neuronas (punta de flecha verde en D). En estos animales también se observaron células positivas a CD163/ED2 que no expresaban la COX-2 (puntas de flechas amarillas en G). En los animales tratados con LPS, se observó una mayor cantidad de estas células coexpresando la COX-2 (puntas de flechas rojas) localizadas en relación a vasos sanguíneos (B, C y E) y distribuidas por el parénquima (F, H e I). V: vaso sanguíneo.



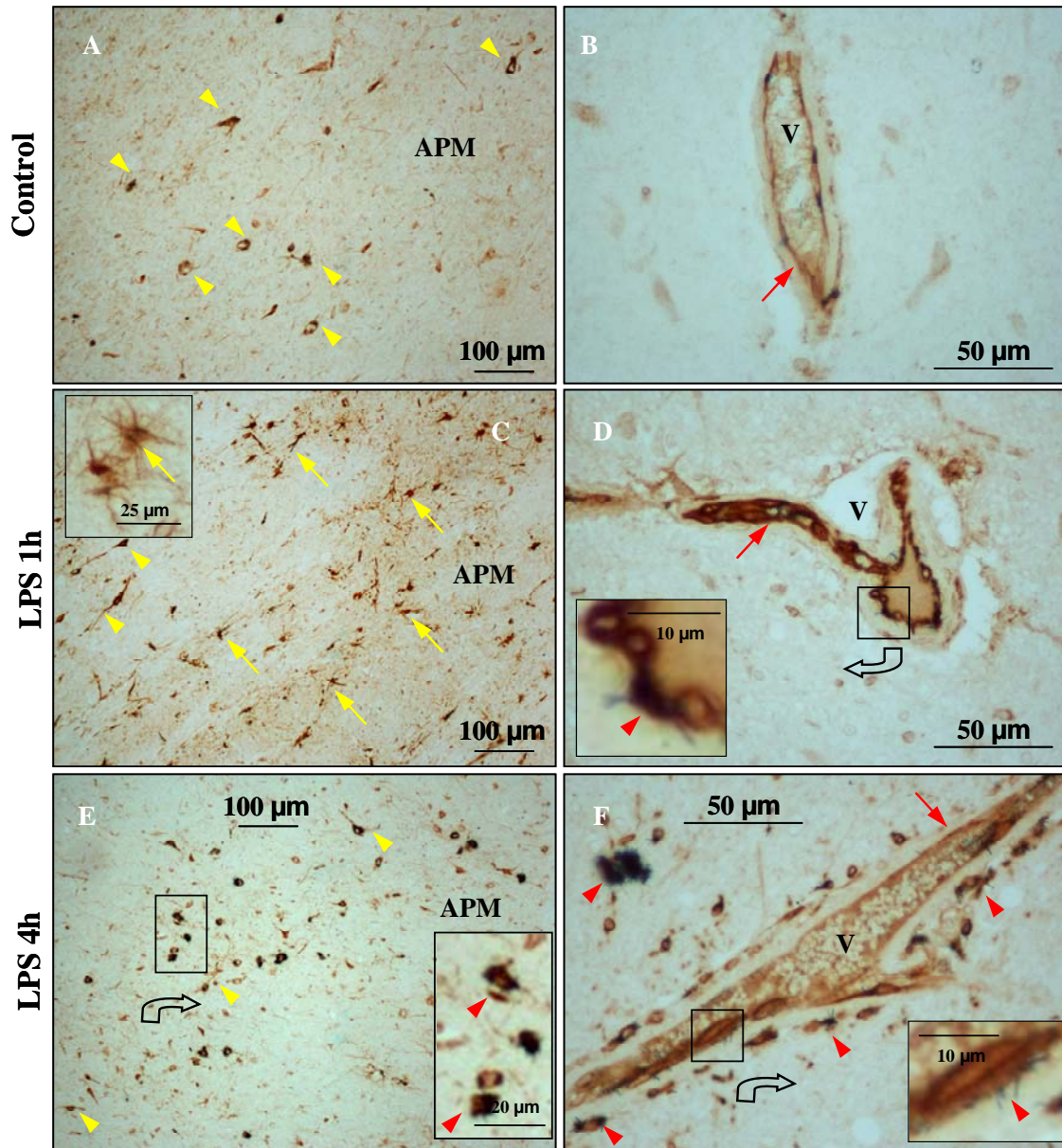
**COX-2 + CD163/ED2****Área preóptica medial**

Figura 4.4.4 - Coexpresión de la COX-2 (tinción marrón) y del marcador de macrófagos perivascuales CD163/ED2 (tinción gris oscuro) en el área preóptica medial de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). Tanto en los animales control como en los tratados con LPS, se observó expresión de COX-2 en una densa población de neuronas, repartidas por el área preóptica medial (puntas de flechas amarillas), así como en endotelios vasculares (flechas rojas). En los animales tratados con LPS durante 1 h, se observó la aparición de células de largas prolongaciones expresando la COX-2 (flechas amarillas). Además, en todos los animales tratados con LPS durante 1 ó 4 horas, se observó la aparición de células redondeadas positivas a CD163/ED2 (puntas de flechas rojas), localizadas en relación a vasos sanguíneos (D y F) y en el parénquima del núcleo preóptico medial a 4 h post-tratamiento (E). Todas estas células coexpresaban la COX-2. APM: área preóptica medial. V: vaso sanguíneo.



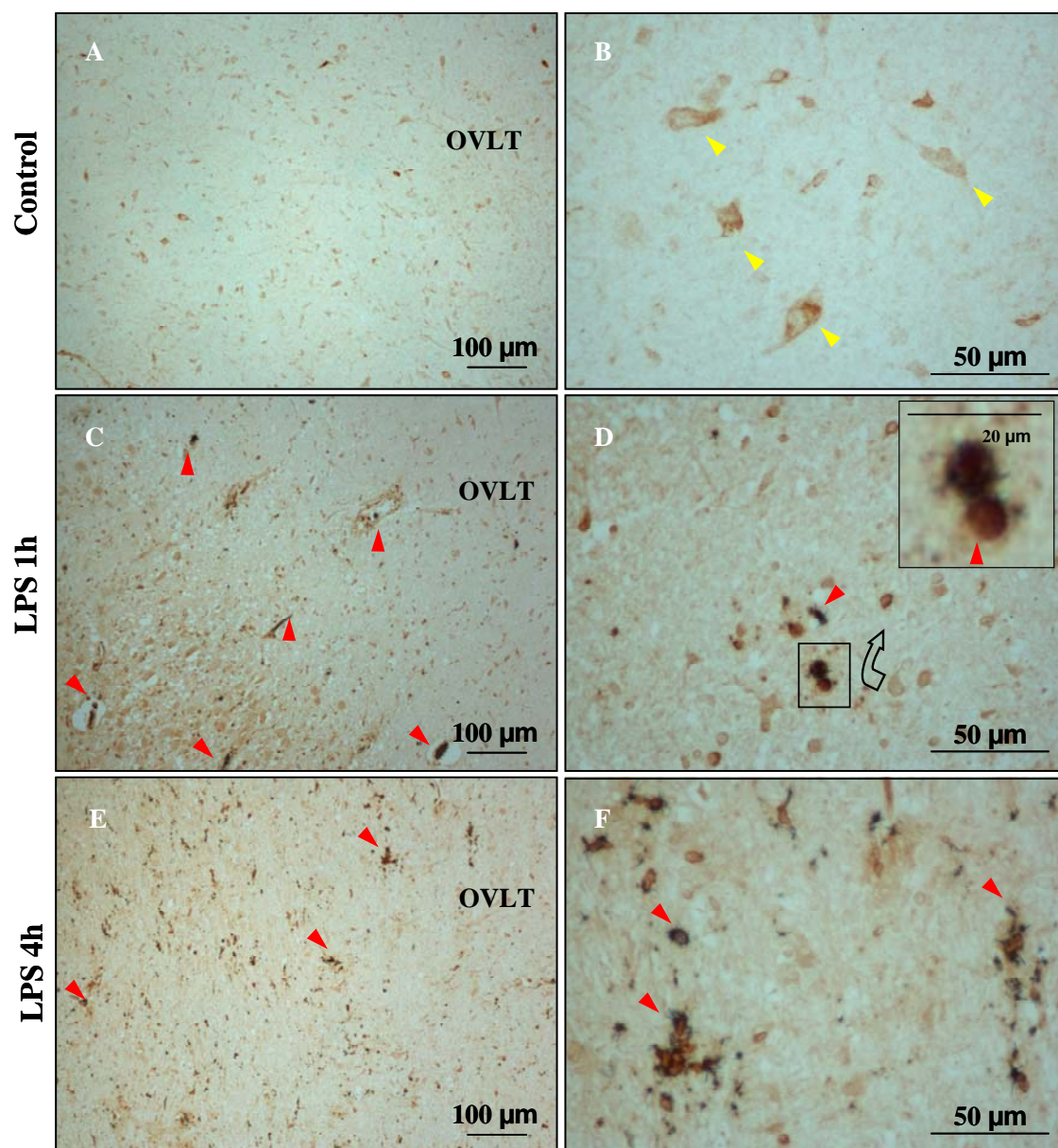
**COX-2 + CD163/ED2****OVLT**

Figura 4.4.5 - Coexpresión de la COX-2 (tinción marrón) y del marcador de macrófagos perivasculares CD163/ED2 (tinción gris oscuro) en órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT) de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). Expresión de COX-2 en neuronas (puntas de flechas amarillas). En la zona del OVLT de los animales tratados, se observó la aparición de células redondeadas positivas a CD163/ED2 (puntas de flechas rojas) y que coexpresaban la COX-2. Estas células eran más abundantes conforme aumentaba el tiempo de tratamiento.

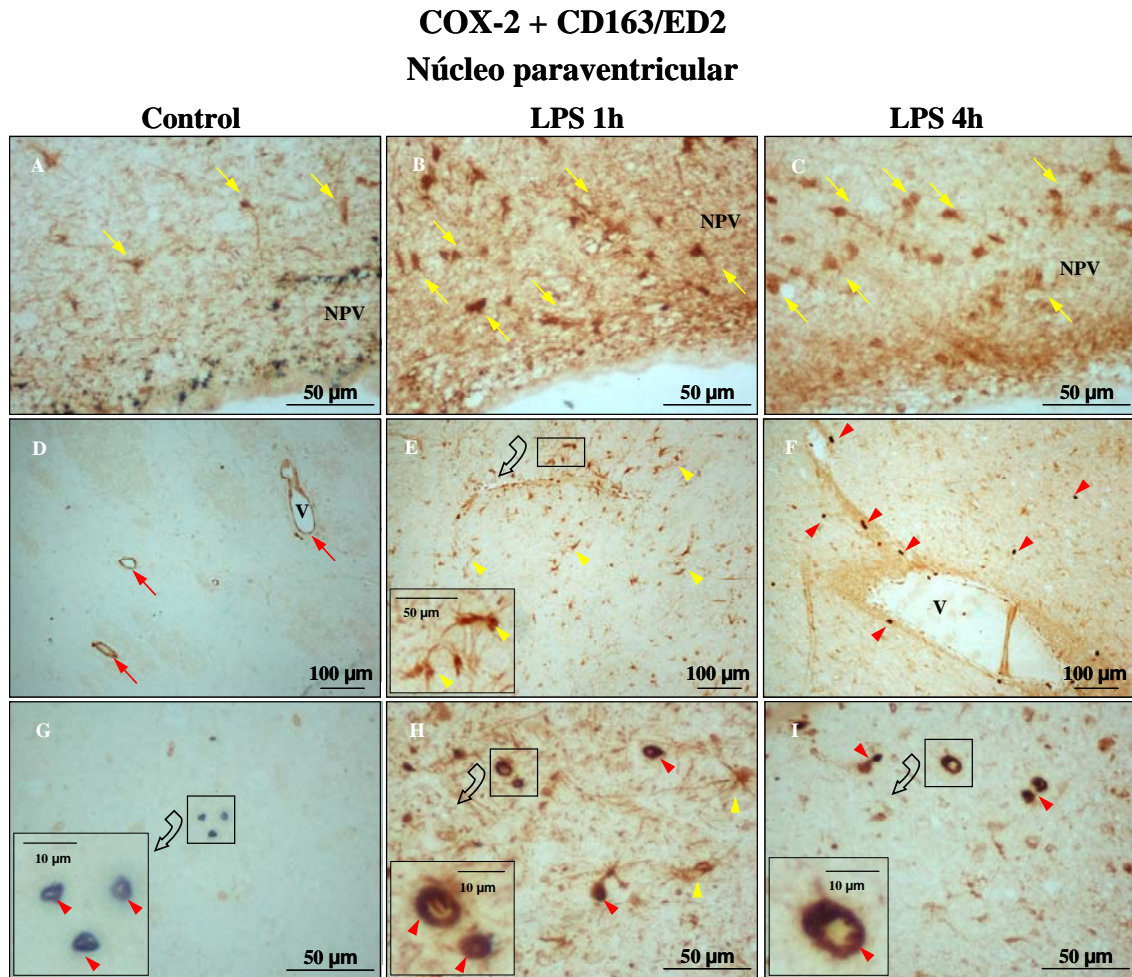


Figura 4.4.6 - Coexpresión de la COX-2 (tinción marrón) y del marcador de macrófagos perivasculares CD163/ED2 (tinción gris oscuro) en la zona hipotalámica de los núcleos paraventricular y anterior de ovejas control (A, D y G) y tratadas con LPS durante 1 hora (B, E y H) ó 4 horas (C, F e I). Tanto en los animales control como en los tratados con LPS, se observó expresión de COX-2 en neuronas del núcleo paraventricular (flechas amarillas en A, B y C) y en endotelios vasculares (flechas rojas) (D). En los animales control, se observaron células positivas a CD163/ED2 (puntas de flechas rojas) (G), pero que no mostraban expresión de COX-2. En los animales tratados con LPS, se observó un aumento en la cantidad de neuronas expresando COX-2 en el núcleo paraventricular (B y C). A 1 h post-tratamiento aparecían células con largas prolongaciones positivas a COX-2 (puntas de flechas amarillas en E y H). En todos los animales tratados con LPS durante 1 ó 4 horas, se observó la aparición de células redondeadas positivas a CD163/ED2 y que coexpresaban COX-2 (puntas de flechas rojas en F, H e I), localizadas en relación a vasos sanguíneos (F) y también repartidas por el parénquima hipotalámico (H e I). NPV: núcleo paraventricular.



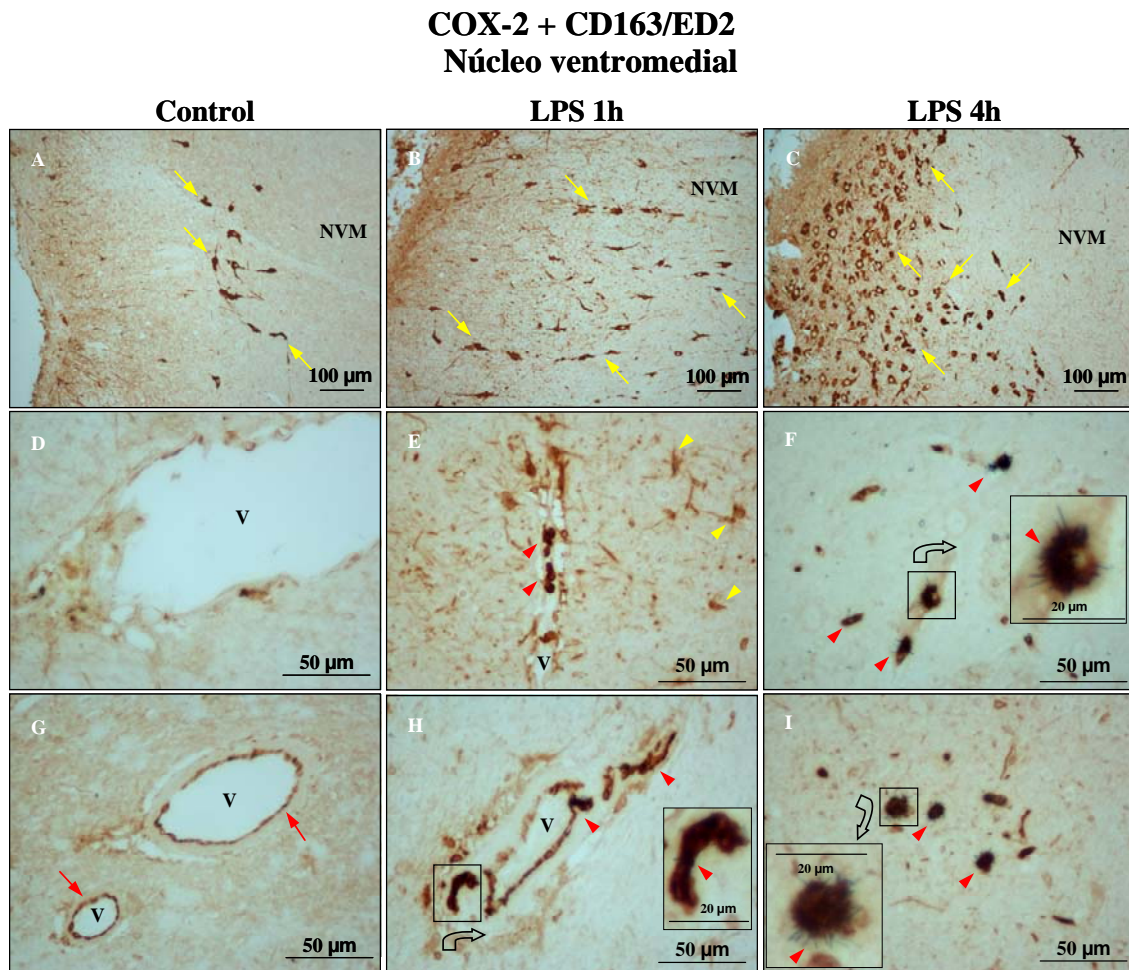


Figura 4.4.7 - Coexpresión de la COX-2 (tinción marrón) y del marcador de macrófagos perivascuales CD163/ED2 (tinción gris oscuro) en la zona hipotalámica de los núcleos dorso y ventromedial de ovejas control (A, D y G) y tratadas con LPS durante 1 hora (B, E y H) ó 4 horas (C, F e I). Tanto en los animales control como en los tratados con LPS, se observó expresión de COX-2 en neuronas del núcleo ventromedial (flechas amarillas en A, B y C) y en endotelios vasculares (flechas rojas) (G). En los animales tratados con LPS se observó un aumento en la cantidad de neuronas expresando COX-2 en el núcleo ventromedial (B y C). A 1 h post-tratamiento aparecían células de largas prolongaciones positivas a COX-2 (puntas de flechas amarillas en E). En todos los animales tratados con LPS durante 1 ó 4 horas, se observó la aparición de células redondeadas positivas a CD163/ED2 que coexpresaban COX-2 (puntas de flechas rojas), localizadas en relación a vasos sanguíneos (E y H) y también repartidas por el parénquima hipotalámico (F e I). NVM: núcleo ventromedial.

#### 4.5 EXPRESIÓN DE LA COX-1 Y LA COX-2 EN TEJIDOS PERIFÉRICOS (HÍGADO Y PULMÓN) DE LA OVEJA

Con el objetivo de verificar si las prostaglandinas implicadas en el inicio de los efectos del LPS podrían proceder de órganos periféricos, decidimos estudiar la expresión y localización de la COX-1 y la COX-2 en el hígado y pulmón de la oveja mediante estudios de WB e IHC. Los experimentos se realizaron con los mismos anticuerpos utilizados anteriormente.

Mediante la técnica de WB, se determinó la expresión de COX-1 y COX-2 en homogenados de hígado y pulmón de ovejas control. Las bandas obtenidas tenían el mismo tamaño previsto para las COX de oveja (70 y 72 kDa para COX-1 y COX-2, respectivamente) y aparecieron a la misma altura que las bandas de los controles positivos comerciales anteriormente mencionados (Figs.4.5.1 y 4.5.2).

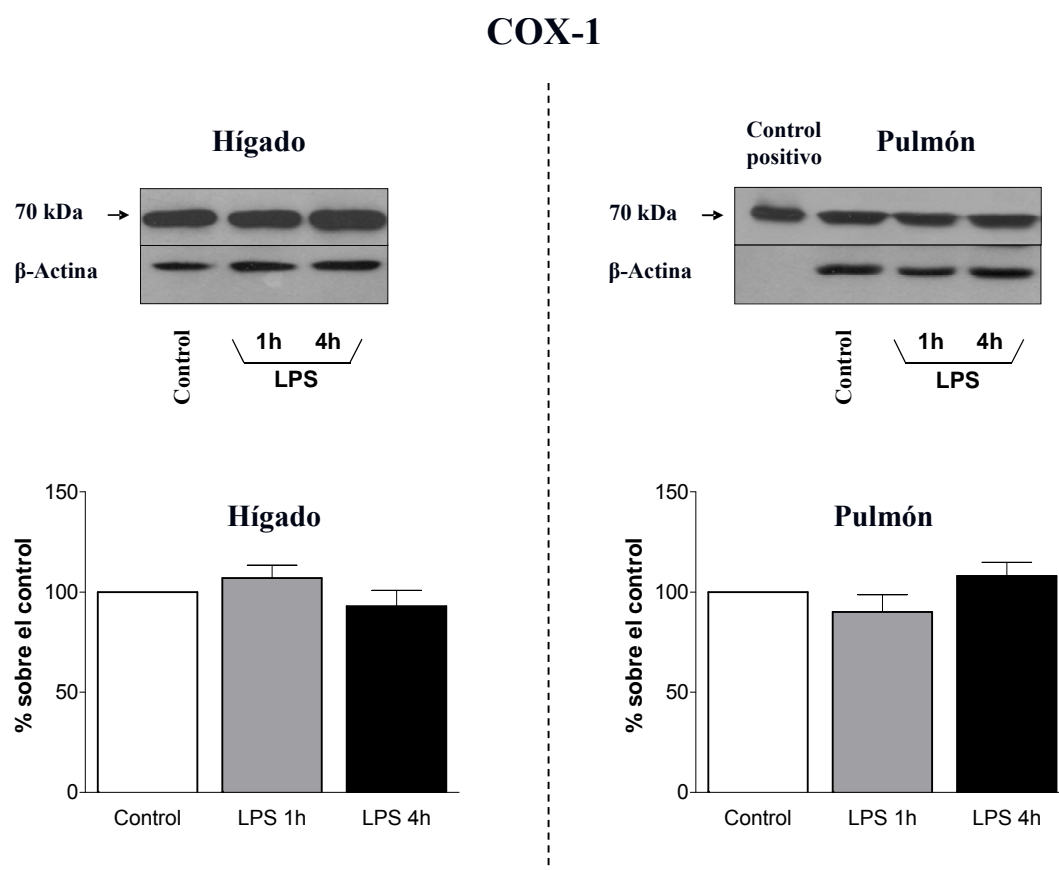


Figura 4.5.1 - Expresión de la COX-1 en homogenados de hígado y pulmón de ovejas control o tratadas con LPS durante 1 ó 4 horas. El WB mostró una banda de 70 kDa. La β-actina se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.

	COX-1	
	Hígado	Pulmón
Control	100 %	100 %
LPS 1h	106,98 ± 6,45 %	90,07 ± 8,59 %
LPS 4h	92,95 ± 7,89 %	108,03 ± 6,83 %

Tabla 4.5.1 - Efecto del tratamiento con LPS sobre la expresión de la COX-1 en el hígado y pulmón de la oveja. La cuantificación de las bandas de los animales tratados con LPS se expresa como porcentaje respecto de los animales control (100%).

## COX-2

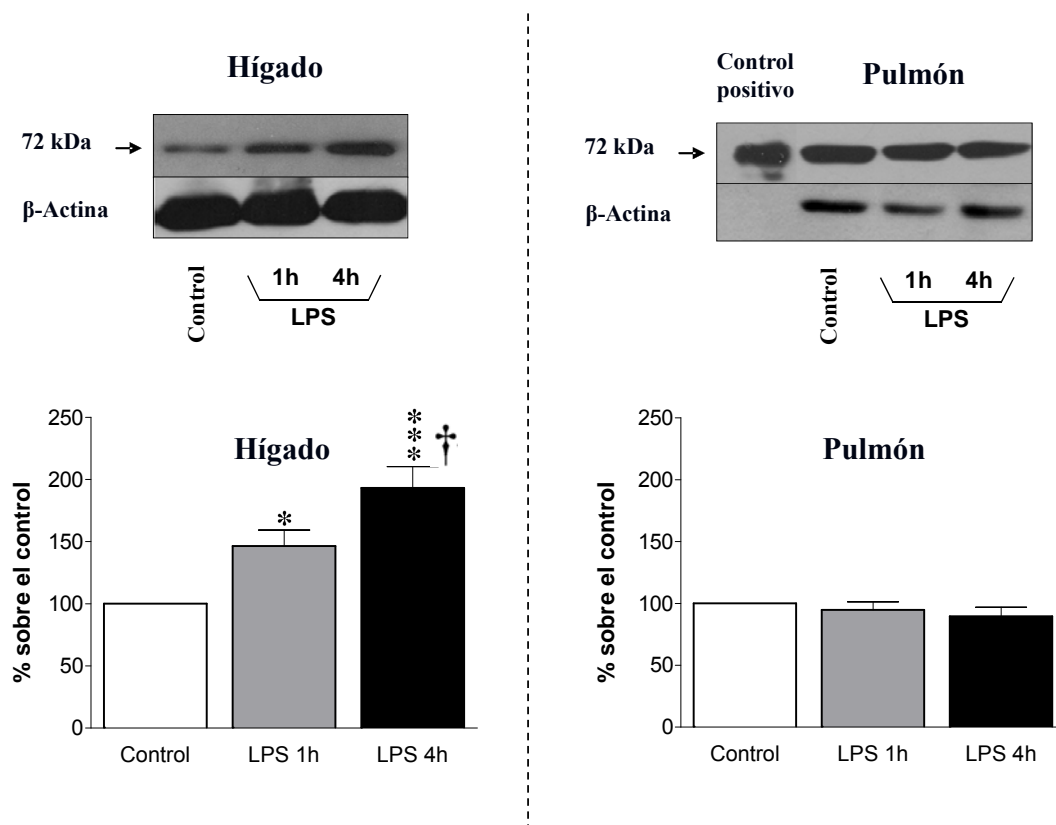


Figura 4.5.2 - Expresión de la COX-2 en homogenados de hígado y pulmón de ovejas control o tratadas con LPS durante 1 ó 4 horas. El WB mostró una banda de 72 kDa. La β-actina se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control. \*P < 0,05 y \*\*\*P < 0,001 con respecto al control.

†P < 0,05 con respecto a LPS 1h.

	COX-2	
	Hígado	Pulmón
<b>Control</b>	100 %	100 %
<b>LPS 1h</b>	146,44 ± 12,88 % (p < 0,05 vs. control)	94,65 ± 6,41 %
<b>LPS 4h</b>	193,08 ± 17,09 % (p < 0,001 vs. control) (p < 0,05 vs. LPS 1h)	89,56 ± 7,35 %

Tabla 4.5.2 - Efecto del tratamiento con LPS sobre la expresión de la COX-2 en el hígado y pulmón de la oveja. La cuantificación de las bandas de los animales tratados con LPS se expresa como porcentaje respecto de los animales control (100%).

Mediante la técnica de IHC, se detectó la expresión de las dos COX en endotelios vasculares de **hígado y pulmón** (Fig. 4.5.3 A; Fig. 4.5.4 C y Fig. 4.5.5 A).

A nivel **hepático**, las dos COX se expresaron en unas células redondeadas próximas a vasos sanguíneos de los espacios porta (Fig. 4.5.3 E y F, y Fig. 4.5.4 B). También se localizaron en algunas células con largas prolongaciones situadas en los espacios sinusoidales, cuya morfología era comparable con células de Kupffer (Fig. 4.5.3 C y D y Fig. 4.5.4 A, C, D, E y F). Sin embargo, los hepatocitos no expresaron la COX-1 ni la COX-2.

Intercaladas en el epitelio de los conductos biliares se observaron unas células que presentaban una morfología a modo de lágrima con su citoplasma intensamente teñido con el anticuerpo frente a la COX-1, pero no expresaban la COX-2 (Fig. 4.5.3 B). Estas células tenían una morfología comparable a células de tipo endocrino.

A nivel **pulmonar**, las dos COX se expresaron en unas células intercaladas en el epitelio de los bronquios y bronquiolos, con su citoplasma intensamente teñido y con una morfología a modo de lágrima, comparables a células de tipo endocrino (Fig. 4.5.5 B y Fig. 4.5.6 A).

Además, se observaban algunas células redondeadas aisladas y localizadas en relación a sacos alveolares que eran positivas a COX-2, pero no mostraban expresión de la COX-1 (Fig. 4.5.6 B).

<b>Hígado</b>	<b>COX-1</b>			<b>COX-2</b>		
	<i>Control</i>	<i>LPS</i>		<i>Control</i>	<i>LPS</i>	
		<i>1 h</i>	<i>4 h</i>		<i>1 h</i>	<i>4 h</i>
<i>Endotelios vasculares</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<i>Células con morfología de tipo endocrino en el epitelio de conductos biliares</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	----	----	----
<i>Células redondas próximas a vasos sanguíneos</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	↑	↑↑
<i>Células con largas prolongaciones (cél. de Kupffer) en los sinusoides hepáticos</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	↑	↑↑
<b>Pulmón</b>	<b>COX-1</b>			<b>COX-2</b>		
	<i>Control</i>	<i>LPS</i>		<i>Control</i>	<i>LPS</i>	
		<i>1 h</i>	<i>4 h</i>		<i>1 h</i>	<i>4 h</i>
<i>Endotelios vasculares</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<i>Células con morfología de tipo endocrino en el epitelio de bronquios</i>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<i>Grupos de células redondeadas próximos a vasos sanguíneos</i>	<b>X</b>	↑	↑↑	<b>X</b>	↑	↑↑
<i>Células redondeadas aisladas por el parénquima</i>	----	----	----	<b>X</b>	↑	↑↑

Tabla 4.5.3 - Resumen de la localización de la COX-1 y la COX-2 en el hígado y pulmón de la oveja. X: expresión de la proteína. ↑: aumento en la expresión de la proteína tras el tratamiento con LPS durante 1 h. ↑↑: aumento mayor en la expresión de la proteína tras el tratamiento con LPS durante 4 h.

## COX-1

### Hígado

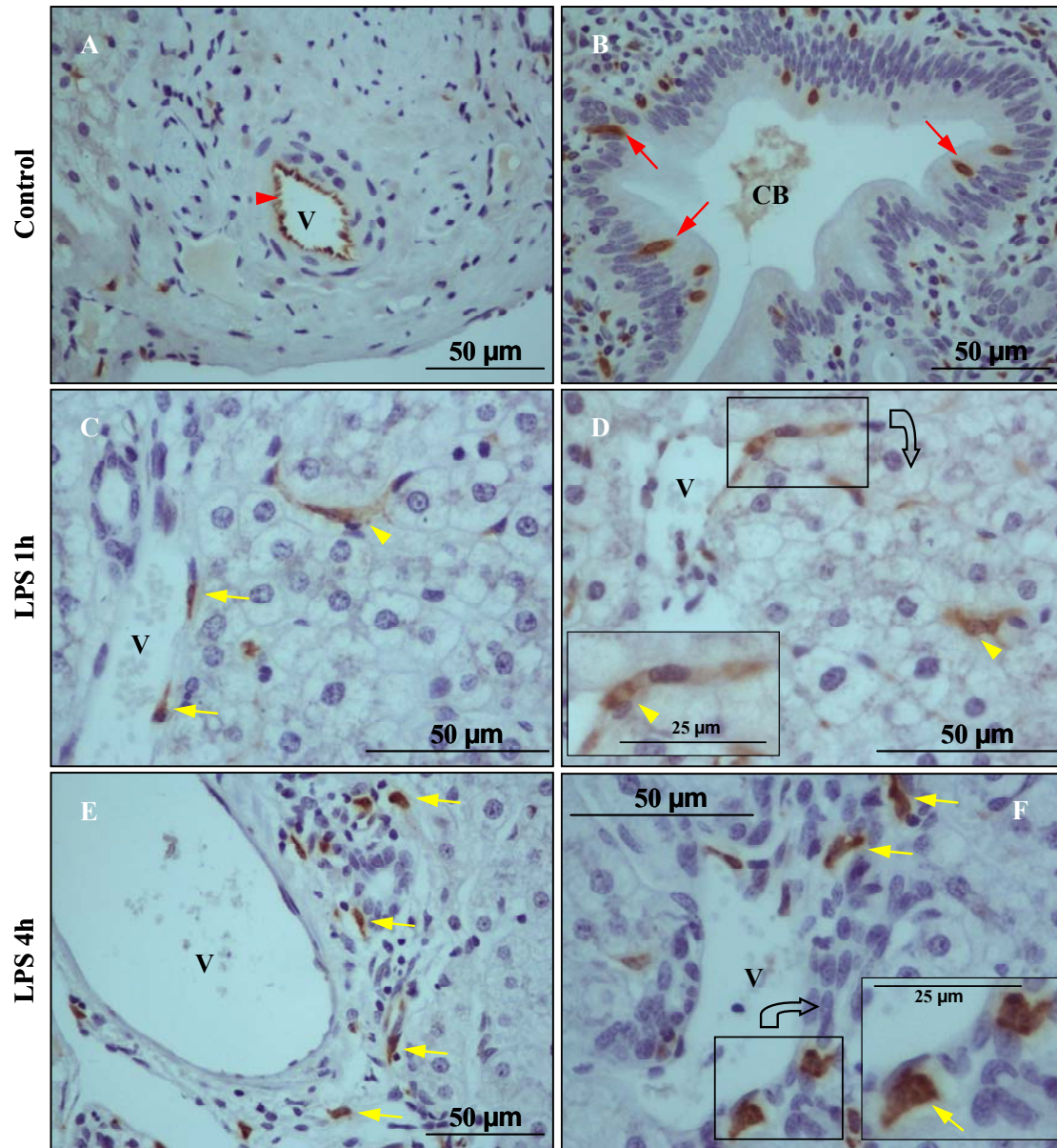


Figura 4.5.3 - Localización de la COX-1 en el hígado de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). El LPS no modificó la expresión descrita en los animales control. La COX-1 se expresó en endotelios vasculares (puntas de flechas rojas en A) y en células intercaladas en el epitelio de conductos biliares (flechas rojas en B). Además, se localizó en células de largas prolongaciones localizadas en los espacios sinusoidales (puntas de flechas amarillas en C y D) y en células de morfología redondeada localizadas próximas a vasos sanguíneos en los espacios porta (flechas amarillas en C, E y F). CB: conducto biliar. V: vaso sanguíneo.



## COX-2

### Hígado

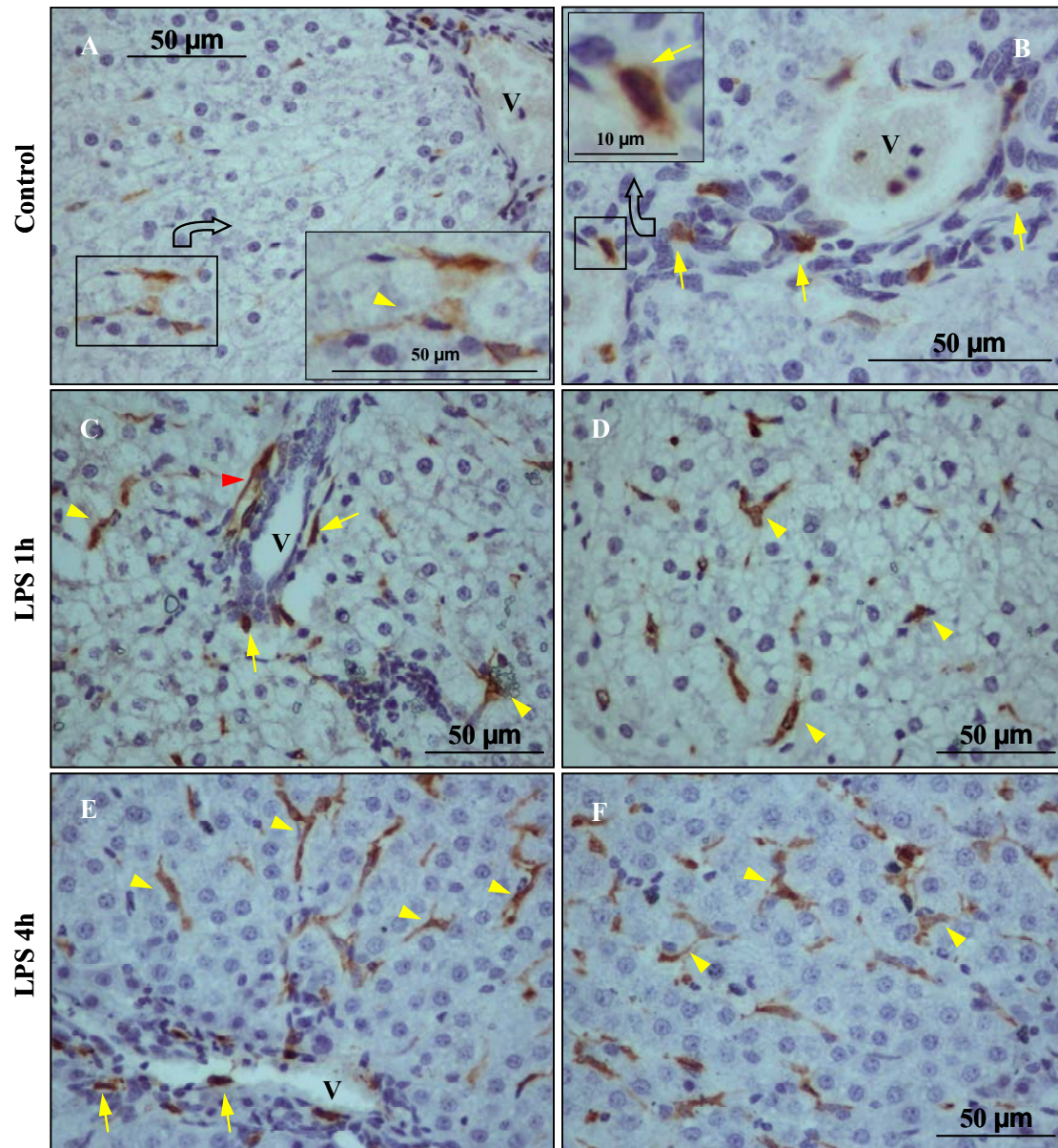


Figura 4.5.4 - Localización de la COX-2 en el hígado de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). La COX-2 se expresó en endotelios vasculares (puntas de flechas rojas en C), en células de largas prolongaciones localizadas en los espacios sinusoidales (puntas de flechas amarillas en A, C, D, E y F) y en células de morfología redondeada situadas próximas a vasos sanguíneos (flechas amarillas en B, C y E). V: vaso sanguíneo.

## COX-1 Pulmón

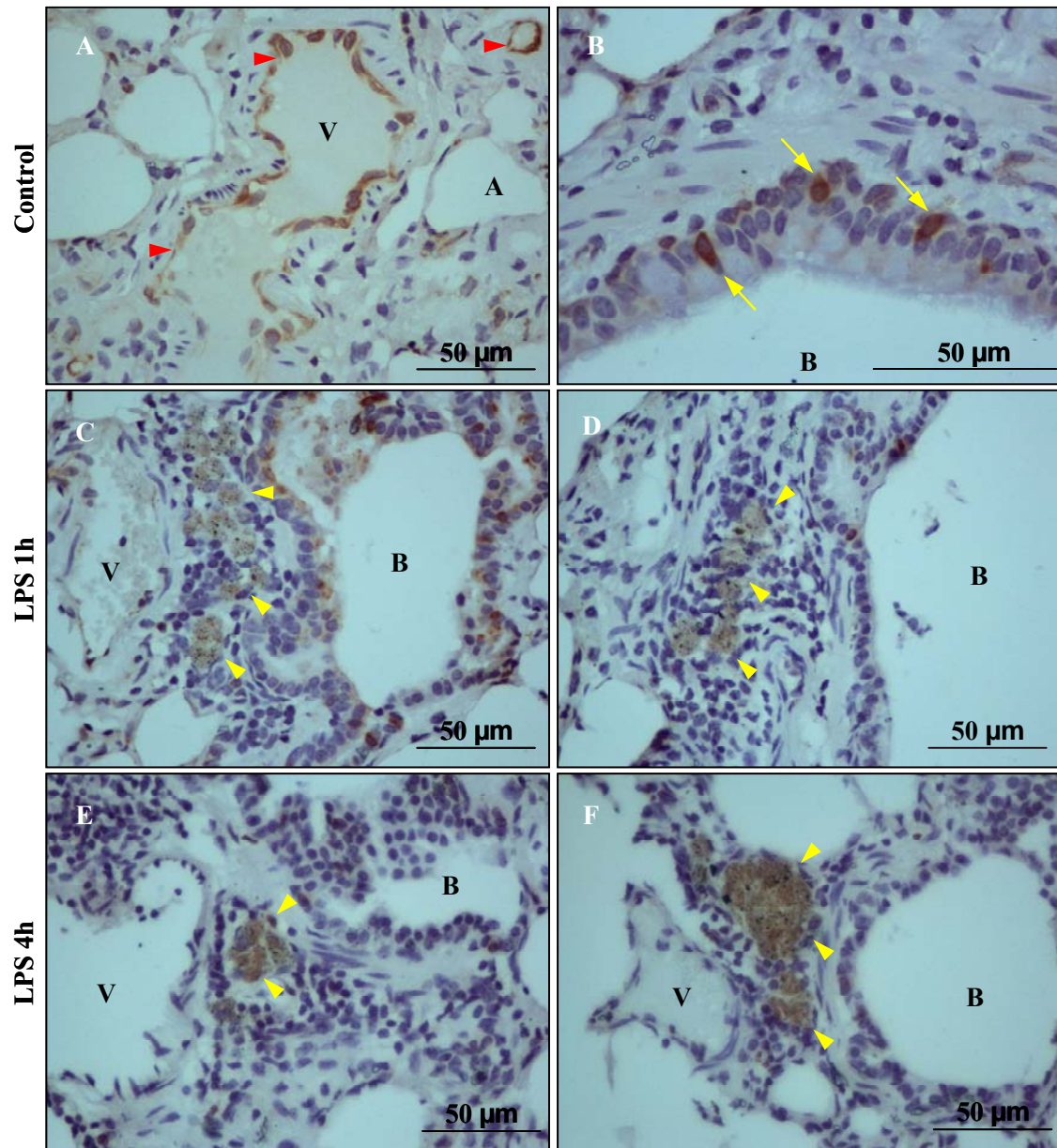


Figura 4.5.5 - Localización de la COX-1 en el pulmón de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). La COX-1 se expresó en endotelios vasculares (puntas de flechas rojas en A) y en unas células intercaladas en el epitelio de bronquiolos con morfología a modo de lágrima (flechas amarillas en B). El tratamiento con LPS durante 1 ó 4 horas indujo la expresión de COX-1 en grupos celulares situados próximos a vasos sanguíneos (puntas de flechas amarillas en C-F). V: vaso sanguíneo. A: alvéolo. B: bronquio.



## COX-2

### Pulmón

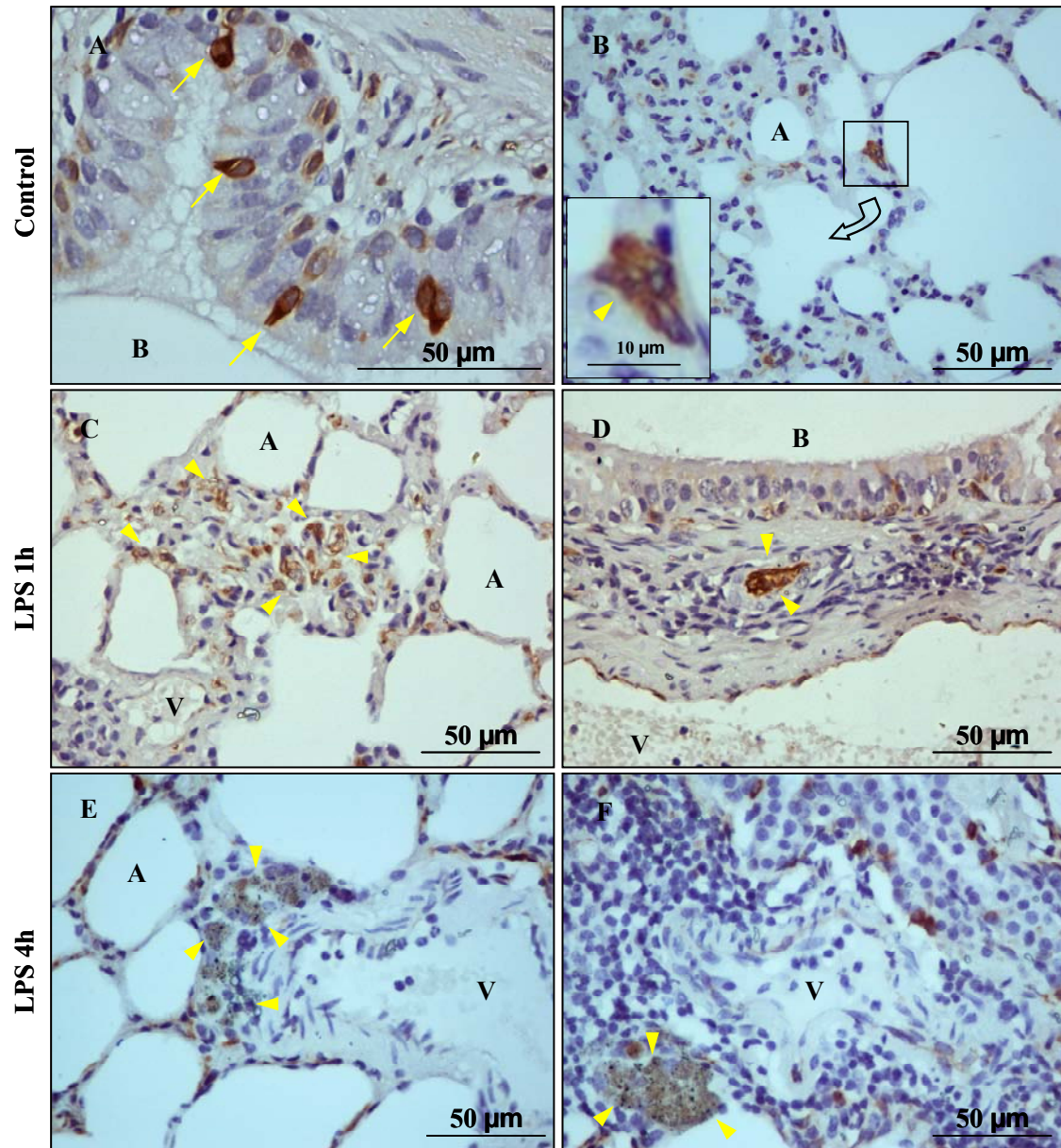


Figura 4.5.6 - Localización de la COX-2 en el pulmón de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). La COX-2 se expresó en unas células intercaladas en el epitelio de bronquiolos con morfología a modo de lágrima (flechas amarillas en A) y en algunas células redondeadas aisladas en el parénquima pulmonar (puntas de flechas amarillas en B). El tratamiento con LPS durante 1 ó 4 horas aumentó la cantidad de células positivas a COX-2 en el parénquima pulmonar, localizándose próximas a vasos sanguíneos (puntas de flechas amarillas en C-F). V: vaso sanguíneo. A: alvéolo. B: bronquio

#### **4.6 EFECTO DEL LPS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA COX-1 Y LA COX-2 EN LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS (HÍGADO Y PULMÓN) DE LA OVEJA**

En el **hígado**, mediante las técnicas de WB e IHC, se comprobó que el tratamiento con LPS no indujo cambios en la expresión de la **COX-1** (Fig. 4.5.1; Fig. 4.5.3 y Tabla 4.5.1).

Sin embargo, ambas técnicas mostraron que el LPS aumenta la expresión de la **COX-2** en el hígado. Concretamente, el WB reveló un aumento en la intensidad de la banda 1 y 4 horas después de la inyección de LPS, hasta valores de 135,5% ( $p<0,01$ ) y 181,69% ( $p<0,001$ ) frente al control respectivamente (Fig. 4.5.2 y Tabla 4.5.2). Por su parte, mediante IHC, se comprobó que estos aumentos en la expresión de la COX-2 se debían a un aumento en el número de las células redondeadas cercanas a vasos sanguíneos y en las células con largas prolongaciones (con morfología de células de Kupffer) ya descritas en el control (Fig. 4.5.4 C, D, E, F). Además, y en concordancia con la técnica de WB, se observó un mayor número de células positivas a COX-2 a las 4 horas que a 1 hora tras el LPS (Fig. 4.5.4 E y F). Sin embargo, el LPS no modificó la expresión de la COX-2 en endotelios vasculares.

En el **pulmón**, mediante la técnica de IHC hemos observado que las células redondeadas positivas a COX-2 que en el control estaban aisladas por el parénquima, tras el tratamiento con LPS durante 1 ó 4 horas aumentaban en número. Además, aparecían numerosos grupos próximos a los vasos sanguíneos de estas células redondeadas positivas a COX-2 (Fig. 4.5.5 y Fig. 4.5.6). Además, todas estas células redondeadas expresaban COX-1 tras la administración de LPS, algo que no se observaba en el control.

El WB no mostró ninguna variación en la expresión de ambas COX en el pulmón a pesar del aumento observado en IHC (Figs. 4.5.1 y 4.5.2; Tablas 4.5.1 y 4.5.2). El LPS no modificó la expresión del resto de los tipos celulares observados en el pulmón.

#### **4.7 IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE COX EN LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS (HÍGADO Y PULMÓN) DE LA OVEJA**

Con la finalidad de determinar la identidad de las células productoras de COX en el hígado y pulmón, recurrimos a la técnica de la doble IHC.

Ya que los macrófagos son la primera línea de defensa ante estímulos patógenos, y dado que la inyección de LPS se realiza por vía periférica, quisimos comprobar la posibilidad de que las células que producen COX-1 y COX-2 como respuesta a la

endotoxina, fueran dicho tipo celular. Así, estudiamos la expresión de las COX junto con un marcador de macrófagos. En el hígado utilizamos el anticuerpo CD163/ED2 anteriormente mencionado en hipotálamo y bulbo raquídeo. En cambio, en el pulmón utilizamos un anticuerpo monoclonal hecho en ratón frente al receptor CD11 de macrófagos pulmonares ovinos (VPM32) (procedente del laboratorio del Dr. NJ Watt).

Cuando los cortes histológicos de **hígado** de animales control se incubaron con el marcador de macrófagos perivasculares CD163/ED2, se observó tinción en unas células redondeadas próximas a vasos sanguíneos (4.7.2 A y D) y en unas células con largas prolongaciones localizadas en los sinusoides hepáticos (4.7.2 G). Los dos tipos de células eran similares a las células que expresaban la COX-1 y la COX-2 en ovejas control y en las que el LPS aumentaba la expresión de COX-2.

Cuando estos mismos cortes se incubaron con el anticuerpo anti-**COX-1** y con el anti-**COX-2**, se observó que las células que expresaban el marcador de macrófagos CD163/ED2 descritas anteriormente, coexpresaban tanto la COX-1 como la COX-2 (Figs. 4.7.1 y 4.7.2).

En el **pulmón**, se realizaron cortes histológicos consecutivos, de los cuales uno se incubó con el anticuerpo anti-**COX-1** y el otro con el marcador de macrófagos pulmonares ovinos VPM32. Ambos anticuerpos teñían las células redondeadas reunidas en grupos próximos a vasos sanguíneos que se observaban tras la administración de LPS (Fig. 4.7.3).

Por su parte, cuando los cortes histológicos de pulmón se incubaron con los anticuerpos anti-**COX-2** y el marcador de macrófagos VPM32, se observó que las células en las que aumentaba la expresión de COX-2 tras el tratamiento con LPS durante 1 ó 4 horas, coexpresaban el marcador de macrófagos VPM32 (Fig. 4.7.4).



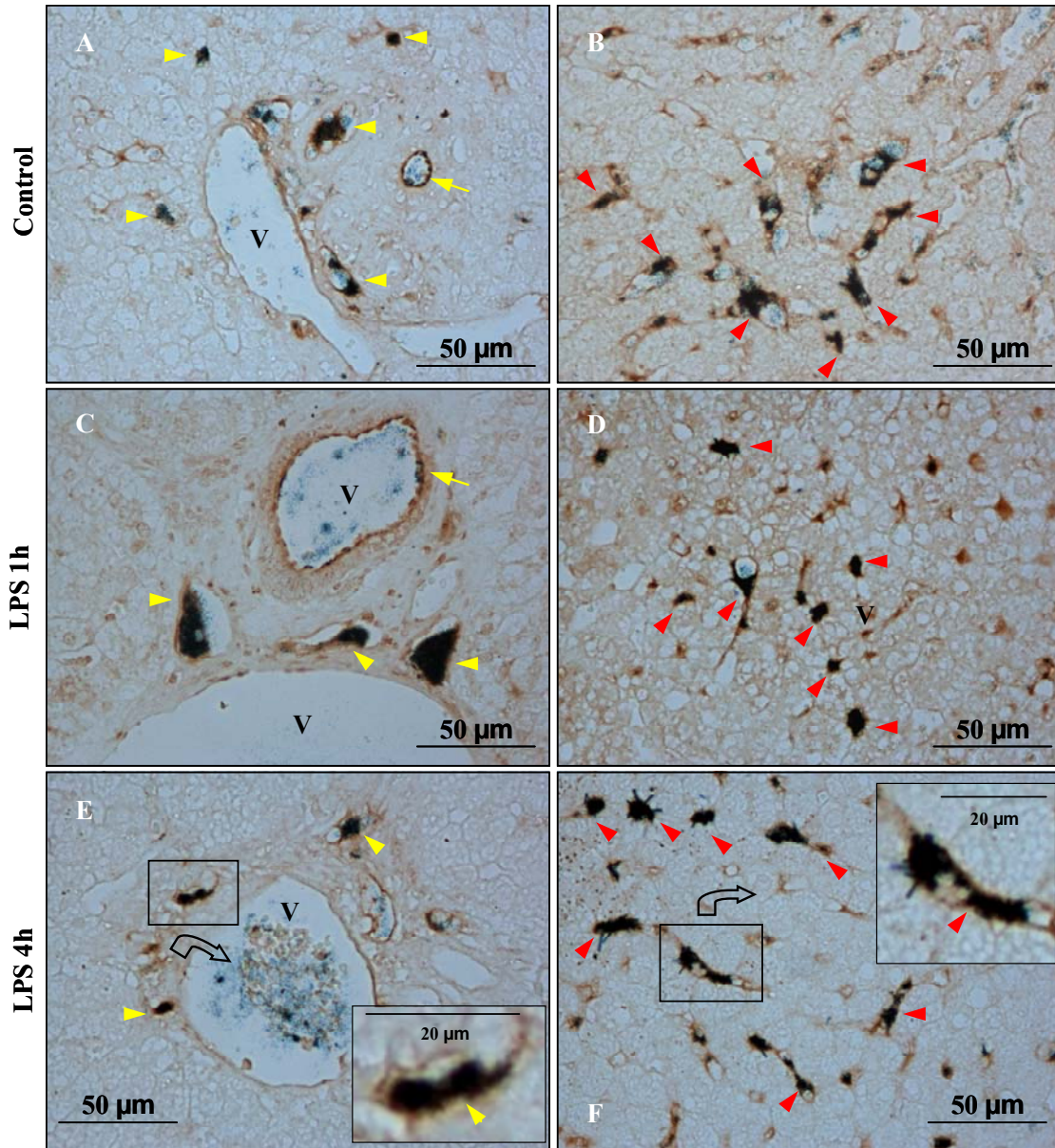
**COX-1 + CD163/ED2****Hígado**

Figura 4.7.1 - Coexpresión de la COX-1 (tinción gris oscuro) y del marcador de macrófagos perivasculares CD163/ED2 (tinción marrón) en el hígado de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). En los animales control y los tratados con LPS se observaron células que coexpresaban CD163/ED2 y COX-1 próximas a vasos sanguíneos (puntas de flechas amarillas) y en los sinusoides hepáticos (puntas de flechas rojas). El LPS no modificó la expresión de COX-1. La COX-1 también se expresó en endotelios vasculares (flechas amarillas). V: vaso sanguíneo.

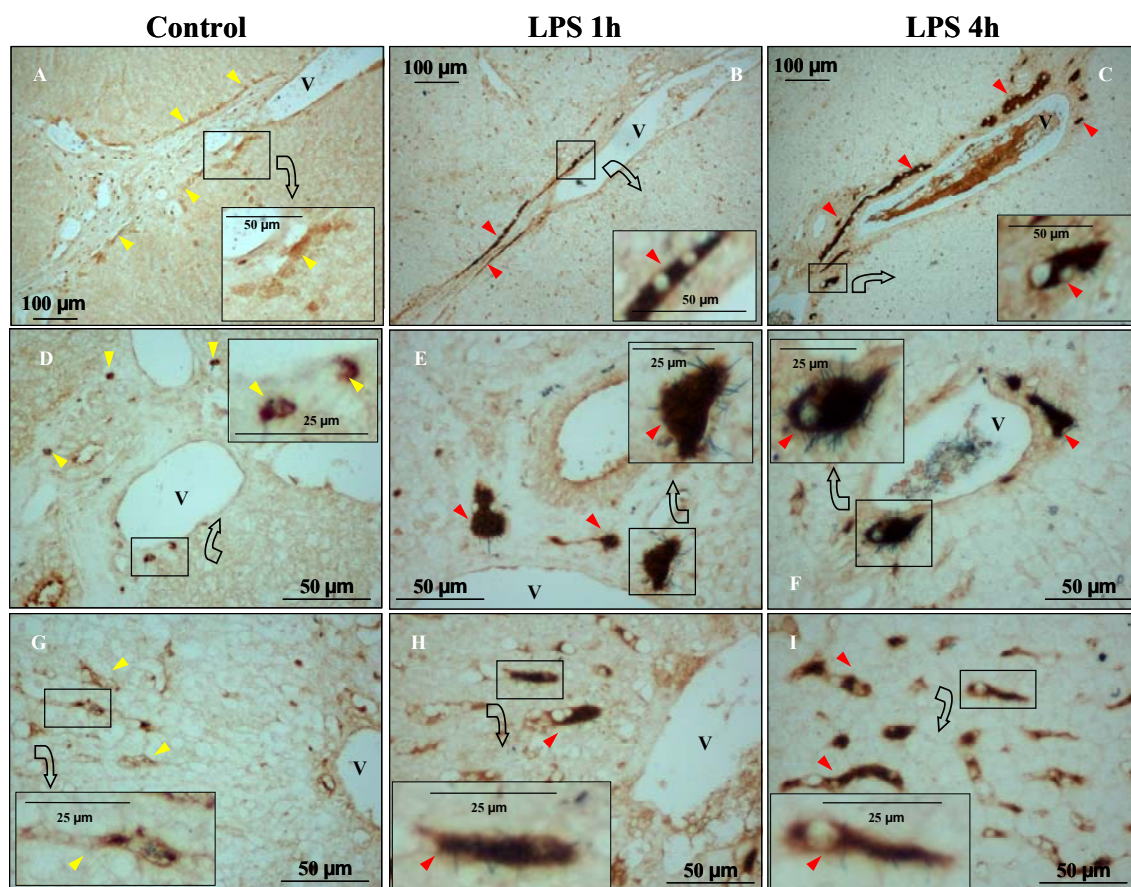
**COX-2 + CD163/ED2****Hígado**

Figura 4.7.2 - Coexpresión de la COX-2 (tinción gris oscuro) y del marcador de macrófagos perivasculares CD163/ED2 (tinción marrón) en el hígado de ovejas control (A, D y G) y tratadas con LPS durante 1 hora (B, E y H) ó 4 horas (C, F e I). En los animales control se observó la presencia de células positivas a CD163/ED2 próximas a vasos sanguíneos y en los sinusoides hepáticos (puntas de flechas amarillas), de las cuales solo algunas coexpresaban la COX-2 pero de forma débil. Sin embargo, el LPS aumentó el número de células que coexpresaban CD163/ED2 y COX-2 (puntas de flechas rojas) siendo este aumento mayor a 4 h que a 1 h del LPS. V: vaso sanguíneo.



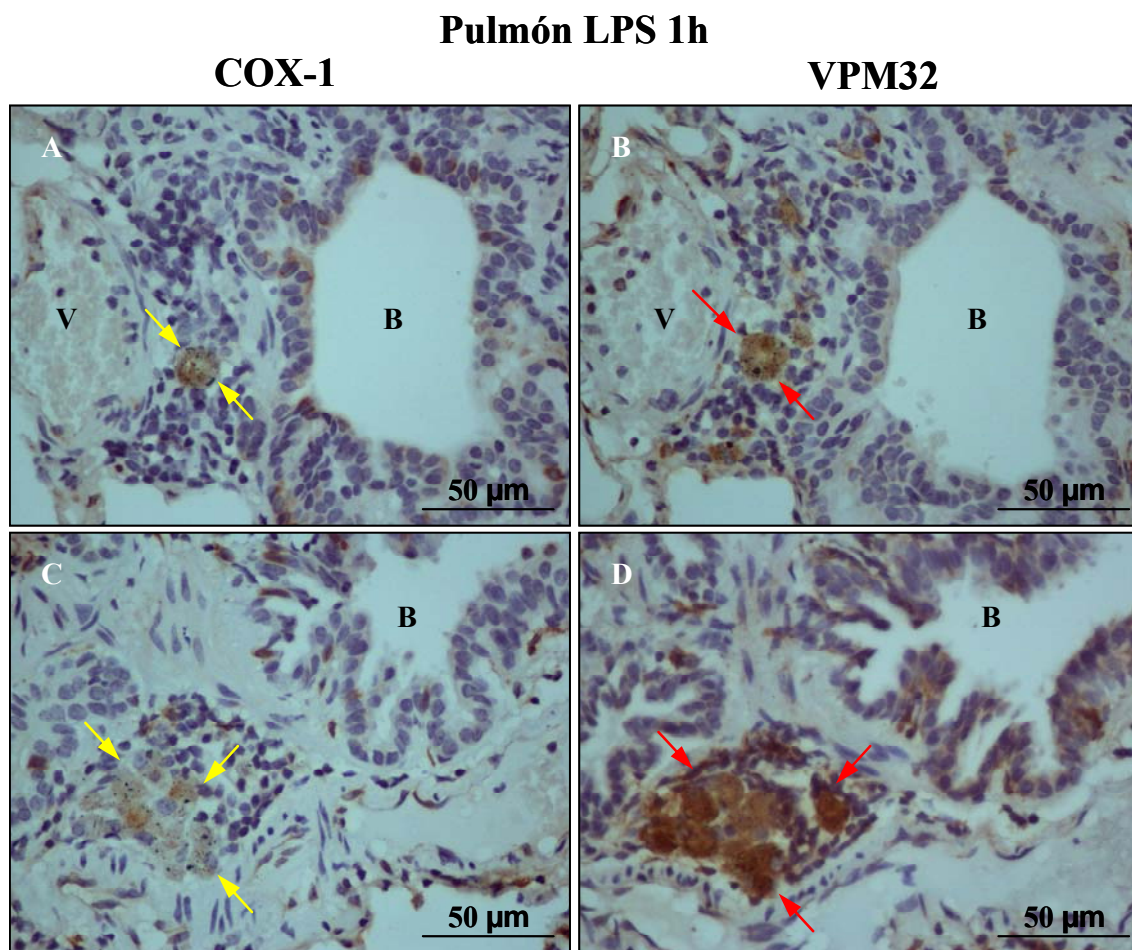


Figura 4.7.3 - Localización de la COX-1 (A y C) y del marcador de macrófagos pulmonares ovinos VPM32 (B y D) en cortes seriados de pulmón de las ovejas tratadas con LPS durante 1 hora. Ambas proteínas se expresaron con una localización similar. B: bronquio. V: vaso sanguíneo.



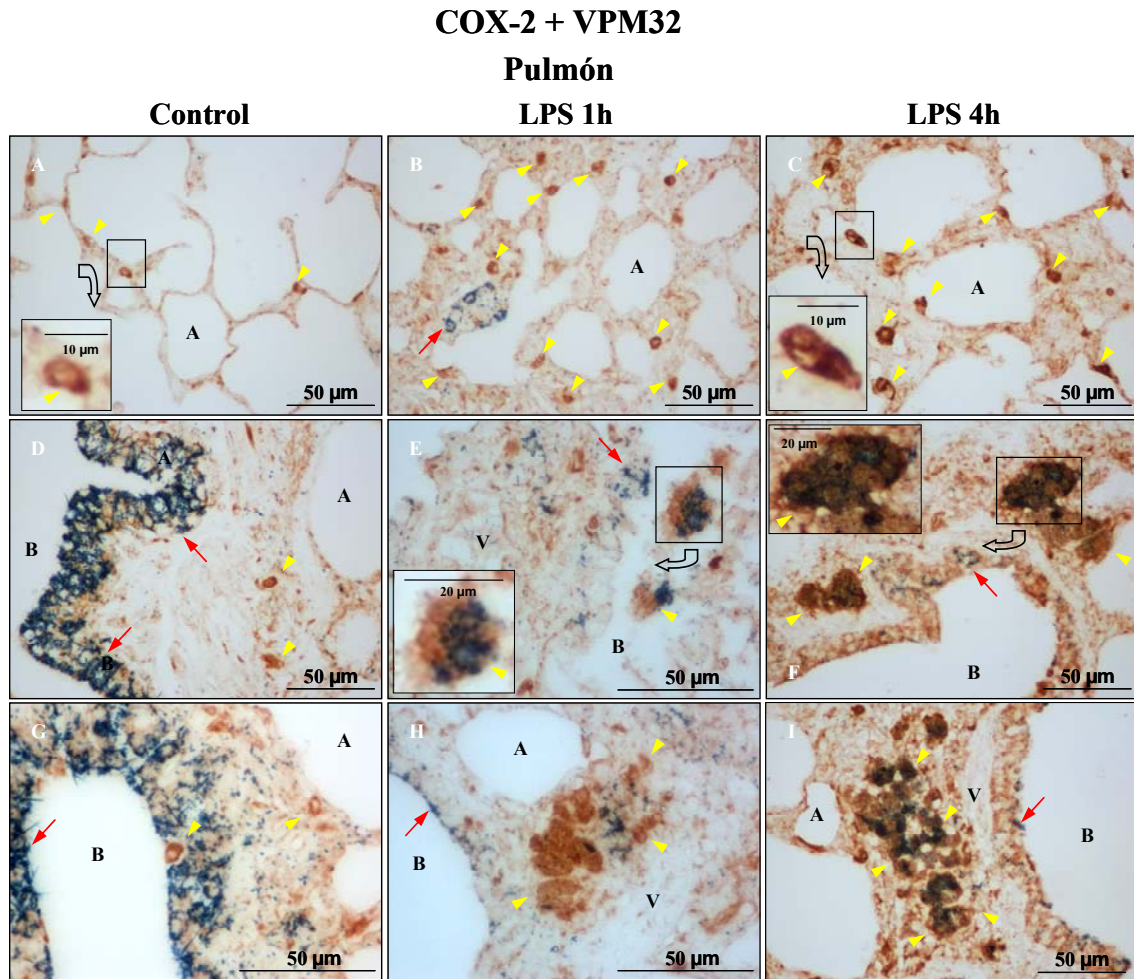


Figura 4.7.4 - Coexpresión de la COX-2 (tinción gris oscuro) y del marcador de macrófagos ovinos VPM32 (tinción marrón) en el pulmón de ovejas control (A, D y G) y tratadas con LPS durante 1 hora (B, E y H) ó 4 horas (C, F e I). En los animales control se observó la presencia de células aisladas positivas a VPM32 (puntas de flechas amarillas en A, D y G). El tratamiento con LPS durante 1 ó 4 horas aumentó el número de células positivas a VPM32 y éstas coexpresaron COX-2, observándose tanto dispersas por el parénquima (puntas de flechas amarillas en B, C) como en grupos y próximas a los vasos sanguíneos (puntas de flechas amarillas en E, F, H e I). En células intercaladas en el epitelio de los bronquios se expresó la COX-2 (flechas rojas). A: alvéolo. B: bronquio. V: vaso sanguíneo.

#### **4.8 EFECTO DE LOS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs) SOBRE LA FIEBRE Y LAS ALTERACIONES MOTORAS GI EN LA OVEJA**

##### **4.8.1 EFECTO DEL AGONISTA EP<sub>3</sub> SULPROSTONA**

La administración icv de sulprostona (agonista de los receptores EP<sub>3</sub> y en menor medida de los EP<sub>1</sub>), a las dosis de 0.4, 2 y 8 nmoles/kg, alteró la temperatura corporal y la motilidad GI de forma dosis-dependiente. Estos trastornos eran similares a los inducidos por la administración iv de LPS.

Inmediatamente tras la administración de sulprostona, la temperatura intraperitoneal experimentaba una subida rápida y aguda, siguiendo una curva monofásica (en lugar de bifásica) y más duradera que la del LPS (Tabla 4.8.1).

Inicialmente y para todas las dosis ensayadas, las ovejas mostraban una sintomatología nerviosa muy marcada: estaban inquietas, emitían balidos de forma muy frecuente, dirigían las orejas hacia detrás con el mismo aspecto que cuando están alerta, escarbaban el suelo, cambiaban constantemente de postura, sentándose y levantándose y tenían ligeros temblores en la parte trasera del cuerpo. Posteriormente, conforme subía la temperatura corporal, estos signos nerviosos cesaban y las ovejas cambiaban a una sintomatología febril con temblores, menor reacción al entorno, pupilas estrechas y orejas dirigidas hacia abajo. Todos estos trastornos cesaban una vez que se alcanzaba el pico máximo de incremento de temperatura.

La dosis de 8 nmol/kg icv indujo un aumento de la temperatura corporal que llegó a ser de 3,04 °C a las 7,5 horas, acompañado por un shock, por lo que se decidió su sacrificio. Esta dosis ya no se ensayó en ninguna oveja más.

Al igual que con el LPS iv, la sulprostona icv indujo alteraciones sobre la motilidad GI (Figuras 4.8.1.1 y 4.8.1.2, Tabla 4.8.1.1). Se produjo un descenso en la actividad mioeléctrica dosis-dependiente. Además, la administración de sulprostona (exceptuando la dosis de 0.4 nmol/kg) provocaba la aparición de un frente de actividad duodenal que se propagaba al yeyuno, quedando aumentada la frecuencia de fases III.

Al contrario que su administración icv, la sulprostona iv a la dosis de 2 nmoles/kg no produjo ningún tipo de alteración sobre el comportamiento, la temperatura corporal o la motilidad GI.

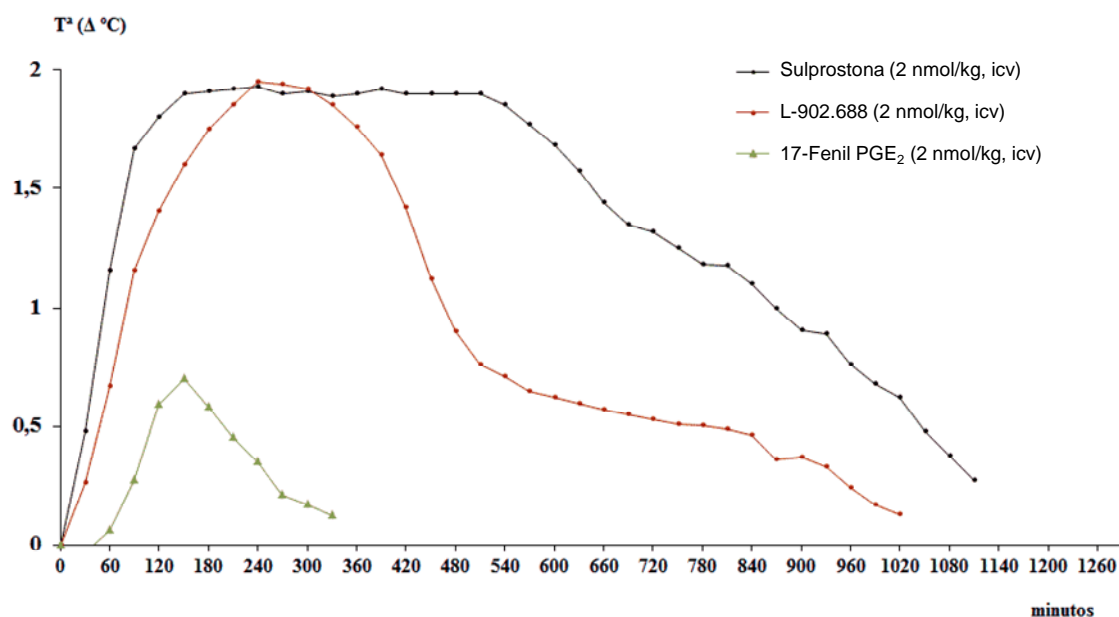


Figura 4.8.1.1 - Efecto de la administración icv de sulprostone (2 nmol/kg), L-902.688 (2 nmol/kg) y 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida (8 nmol/kg) sobre la temperatura corporal.

<b>Sulprostone</b> (nmoles/kg, icv)	<b>0.4</b>	<b>2</b>
$\Delta T^a$ máximo ( $^\circ\text{C}$ )	$0,58 \pm 0,10$ ***	$1,39 \pm 0,15$ ***
Inicio $\Delta T^a$ (min)	$27,80 \pm 2,22$	$46,40 \pm 14,90$
Duración $\Delta T^a$ (h)	$10,79 \pm 1,45$	$16,88 \pm 1,77$
Inicio en antro (min)	$40,95 \pm 12,67$	$33,89 \pm 3,57$
Duración antro (h)	$80,27 \pm 19,45$	$235,51 \pm 18,40$
1 <sup>a</sup> fase III (min)	$68,84 \pm 13,78$	$68,84 \pm 13,78$
Duración fase III (h)	$102,25 \pm 12,55$	$188,00 \pm 41,88$

Tabla 4.8.1.1 - Efecto de la administración icv de sulprostone sobre la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. \*\*\*  $P < 0,001$  sobre el control (administración del solvente).

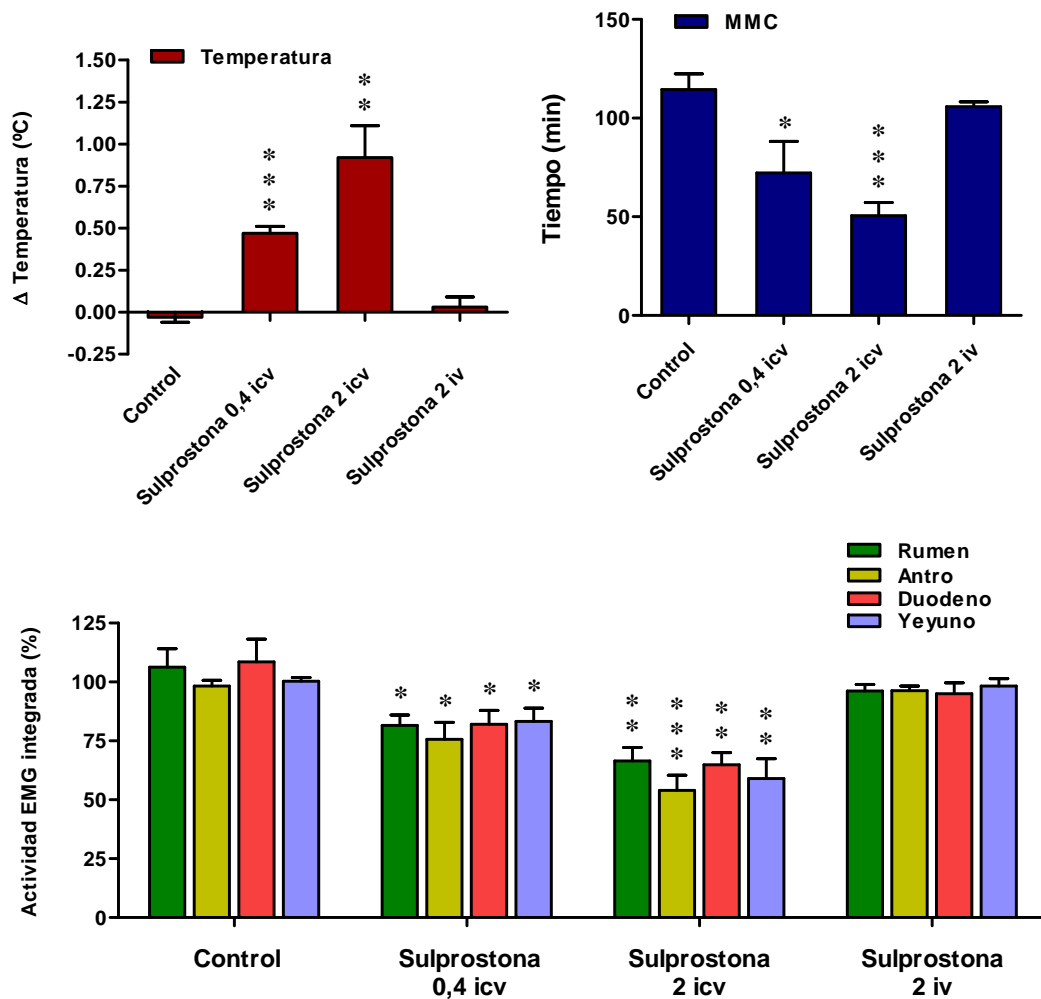


Figura 4.8.1.2 - Efecto de la administración icv de sulprostone sobre la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  y \*\*\*  $P < 0,001$  sobre el control (administración del solvente).

#### 4.8.2 EFECTO DEL AGONISTA EP<sub>1</sub> 17-FENIL TRINOR PGE<sub>2</sub>

La administración icv de 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida (agonista del receptor EP<sub>1</sub> y en menor medida del receptor EP<sub>3</sub>) a las dosis de 2 y 8 nmoles/kg reprodujo la respuesta inducida por la sulprostone sobre el comportamiento, apareciendo los mismos signos de nerviosismo descritos anteriormente para la sulprostone.

La dosis de 2 nmoles/kg no alteró la temperatura corporal ni la motilidad GI. Sin embargo, la administración de 8 nmoles/kg produjo un aumento monofásico de la temperatura corporal de unos 0,5 °C que sólo duraba aproximadamente una hora.

También provocaba una inhibición de la motilidad gastrointestinal e inducía la aparición de un frente de actividad duodenal que se propagaba al yeyuno. Sin embargo no modificó la frecuencia de fases III (Figura 4.8.2.1, Tabla 4.8.2.1).

El 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> iv a la dosis de 8 nmoles/kg no produjo ningún tipo de alteración sobre el comportamiento, la temperatura corporal o la motilidad GI.

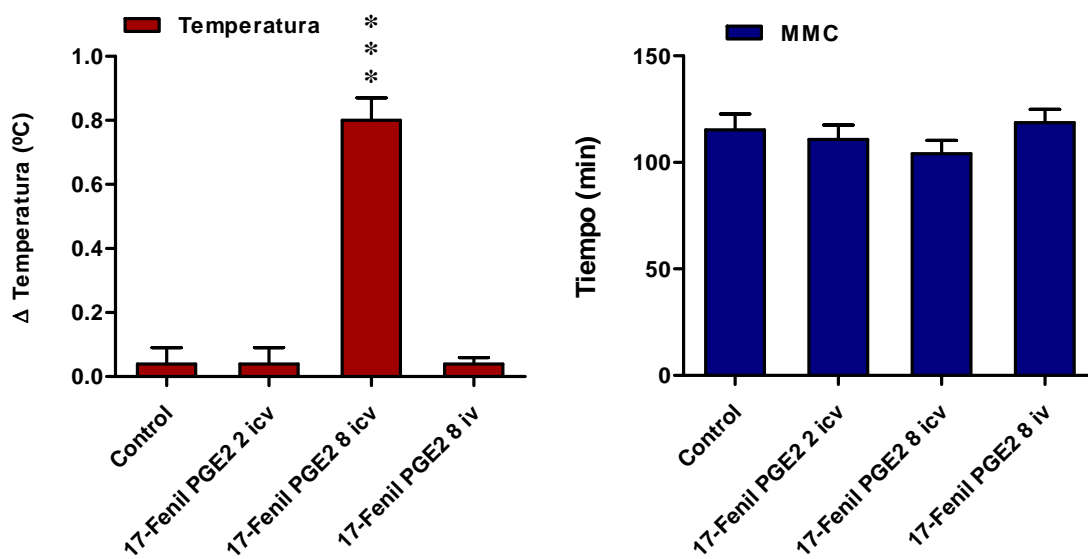


Figura 4.8.2.1 - Efecto de la administración icv de 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida sobre la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. \*\*\* P<0,001 sobre el control (administración del solvente).

<b>17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida (nmoles/kg, icv)</b>	<b>8</b>
$\Delta T^a$ máximo (°C)	$0,54 \pm 0,04$ ***
Inicio $\Delta T^a$ (min)	$228,00 \pm 20,75$
Duración $\Delta T^a$ (h)	$0,67 \pm 0,07$
Inicio en antro (min)	$38,25 \pm 7,32$
Duración antro (h)	$93,86 \pm 18,21$
1ª fase III (min)	$57,07 \pm 17,04$

Tabla 4.8.2.1 - Efecto de la administración icv de 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida sobre la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. \*\*\*  $P < 0,001$  sobre el control (administración del solvente).

#### 4.8.3 EFECTO DEL AGONISTA EP<sub>2</sub> BUTAPROST

La administración de butaprost (agonista del receptor EP<sub>2</sub>) por vía icv a las dosis de 2, 4 y 8 nmoles/kg o por vía iv a la dosis de 8 nmoles/kg no modificó la temperatura corporal ni la motilidad GI (Figura 4.8.3.1). Tampoco provocó la sintomatología nerviosa observada con el 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida y con la sulprostona.

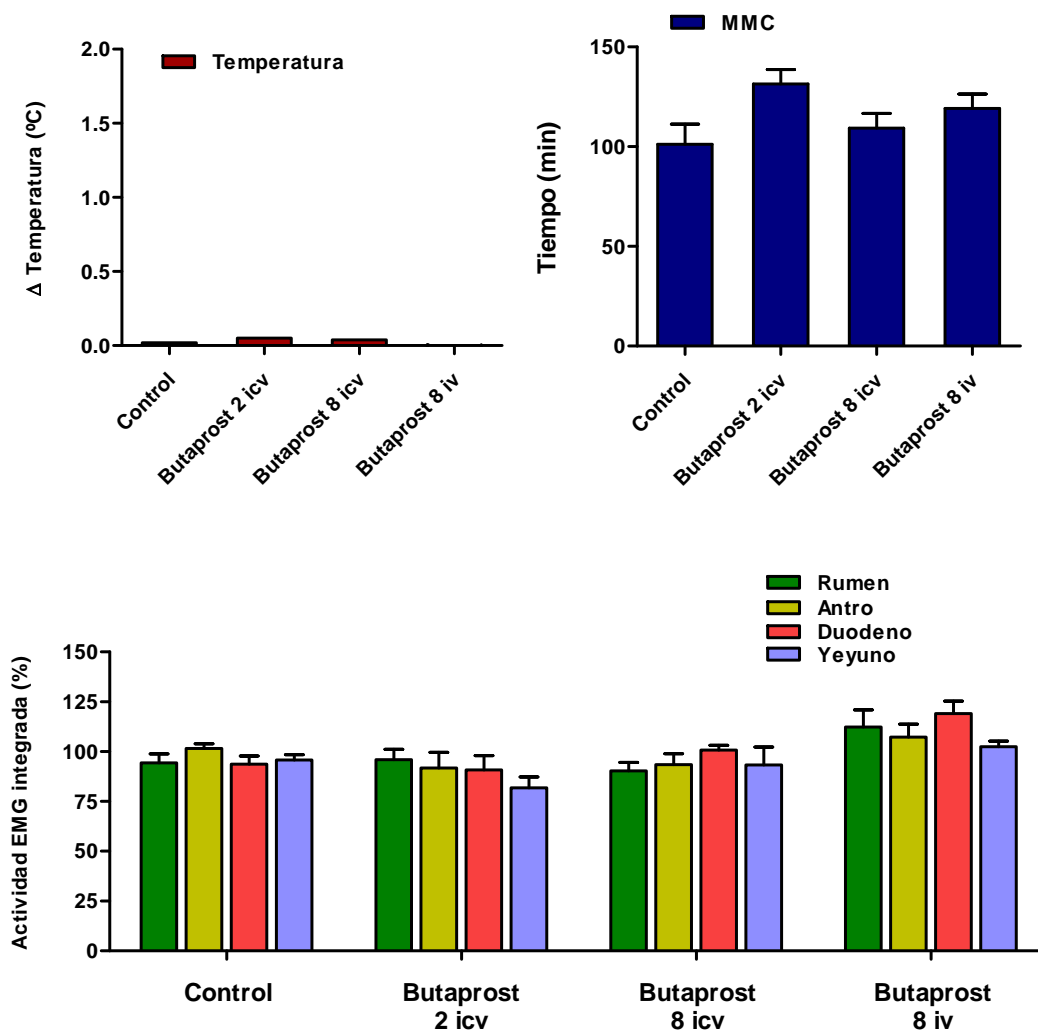


Figura 4.8.3.1 - Efecto de la administración icv de 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida sobre la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. \*\*\*  $P < 0,001$  sobre el control (administración del solvente).

#### 4.8.4 EFECTO DEL AGONISTA EP<sub>4</sub> L-902,688

La administración de L-902,688 (agonista del receptor EP<sub>4</sub>) por vía icv a las dosis de 0,4 y 2 nmoles/kg producía un aumento de la temperatura corporal de manera dosis-dependiente, experimentando una subida rápida y aguda, y siguiendo una curva monofásica (Tabla 4.8.4.1). Al igual que el butaprost, no se observó sintomatología nerviosa.

El L-902.688 icv indujo alteraciones sobre la motilidad GI (Figura 4.8.4.1, Tabla 4.8.4.1) similares a las observadas con el LPS iv. Así, se observó un descenso dosis-dependiente en la actividad mioeléctrica. Además, la administración de todas estas dosis

producía la aparición de un frente de actividad duodenal que se propagaba al yeyuno, quedando aumentada la frecuencia de fases III durante varias horas.

El L-902,688 iv a la dosis de 2 nmoles/kg no produjo ningún tipo de alteración sobre la temperatura ni la motilidad GI.

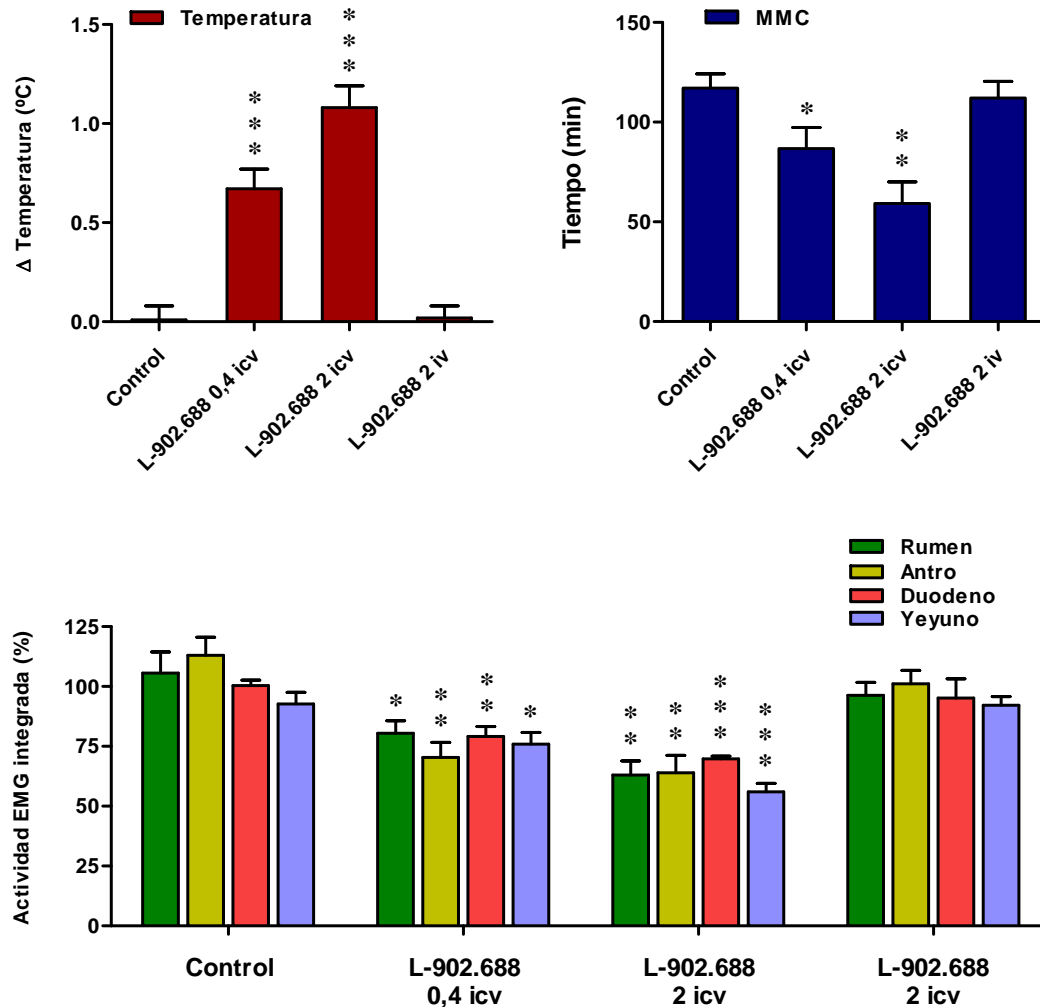


Figura 4.8.4.1 - Efecto de la administración icv de L-902,688 sobre la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  y \*\*\*  $P < 0,001$  sobre el control (administración del solvente).



<b>L-902,688</b> (nmoles/kg, icv)	<b>0.4</b>	<b>2</b>
$\Delta T^a$ máximo (°C)	$0,87 \pm 0,11$ ***	$1,43 \pm 0,22$ ***
Inicio $\Delta T^a$ (min)	$46,20 \pm 10,28$	$25,00 \pm 4,09$
Duración $\Delta T^a$ (h)	$6,87 \pm 0,29$	$14,41 \pm 1,90$
Inicio en antro (min)	$46,00 \pm 10,91$	$64,33 \pm 7,50$
Duración antro (h)	$244,28 \pm 42,01$	$373,18 \pm 70,58$
1ª fase III (min)	$53,40 \pm 10,42$	$8,20 \pm 1,16$
Duración fase III (h)	$171,00 \pm 29,96$	$384,40 \pm 47,64$

Tabla 4.8.4.1 - Efecto de la administración icv de L-902,688 sobre la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. \*\*\*  $P < 0,001$  sobre el control (administración del solvente).

#### 4.9 EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs) EN EL HIPOTÁLAMO Y BULBO RAQUÍDEO DE LA OVEJA

Se realizaron estudios de WB e IHC para detectar la expresión y localización de los receptores de la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>) en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja. Los experimentos se realizaron con Acs policlonales hechos en conejo frente al extremo C-terminal de los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> humanos (Refs. 101740, 101750, 101760 y 101750 respectivamente, Cayman Chemical) y validados previamente mediante WB en tejidos ovinos (Schmitz y cols., 2006).

Se utilizó un homogenado de riñón de oveja como control positivo, dado que la expresión de los receptores EPs de la PGE<sub>2</sub> ha sido ampliamente determinada en dicho tejido (Breyer and Breyer, 2000; Williams y cols. 2004; Breyer y cols., 1993; Breyer y cols., 1996; Watabe y cols., 1993). Los Acs empleados en este estudio revelaron la presencia de bandas de 56, 67, 62 y 64 kDa en las calles del control positivo y de las muestras estudiadas. Estos tamaños coinciden con los previstos para las proteínas EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> ovinas, respectivamente. Como se esperaba, al incubar los tejidos omitiendo los Acs primarios, no se observaron bandas específicas (Fig. 4.9.1).

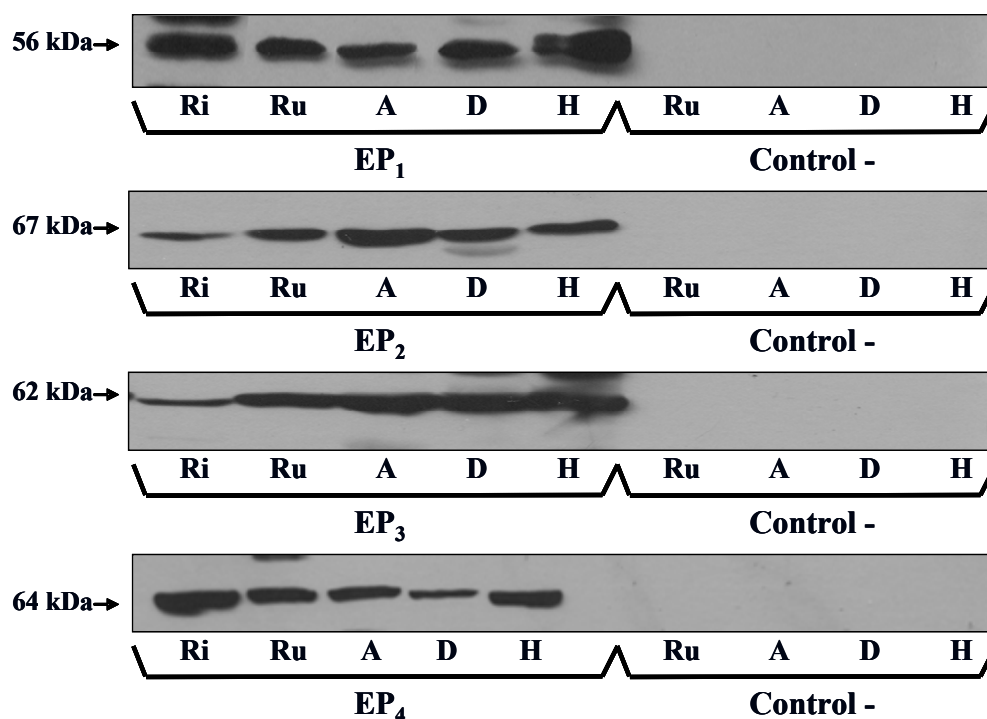


Figura 4.9.1 - Expresión de los receptores EP<sub>s</sub> en homogenados de riñón (Ri), rumen (Ru), antro (A), duodeno (D) e hipotálamo (H) de ovejas control. El WB mostró unas bandas de 56, 67, 62 y 64 kDa correspondiendo a los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> respectivamente. La omisión del anticuerpo primario produjo la desaparición de dichas bandas (Control -).

Para analizar la especificidad de la tinción en la IHC, se realizaron experimentos incubando cortes histológicos consecutivos con el Ac primario o sin él (control negativo). A diferencia de los cortes incubados con los Acs primarios, en los controles negativos no se observó tinción específica frente a los receptores EP (Fig. 4.9.2).

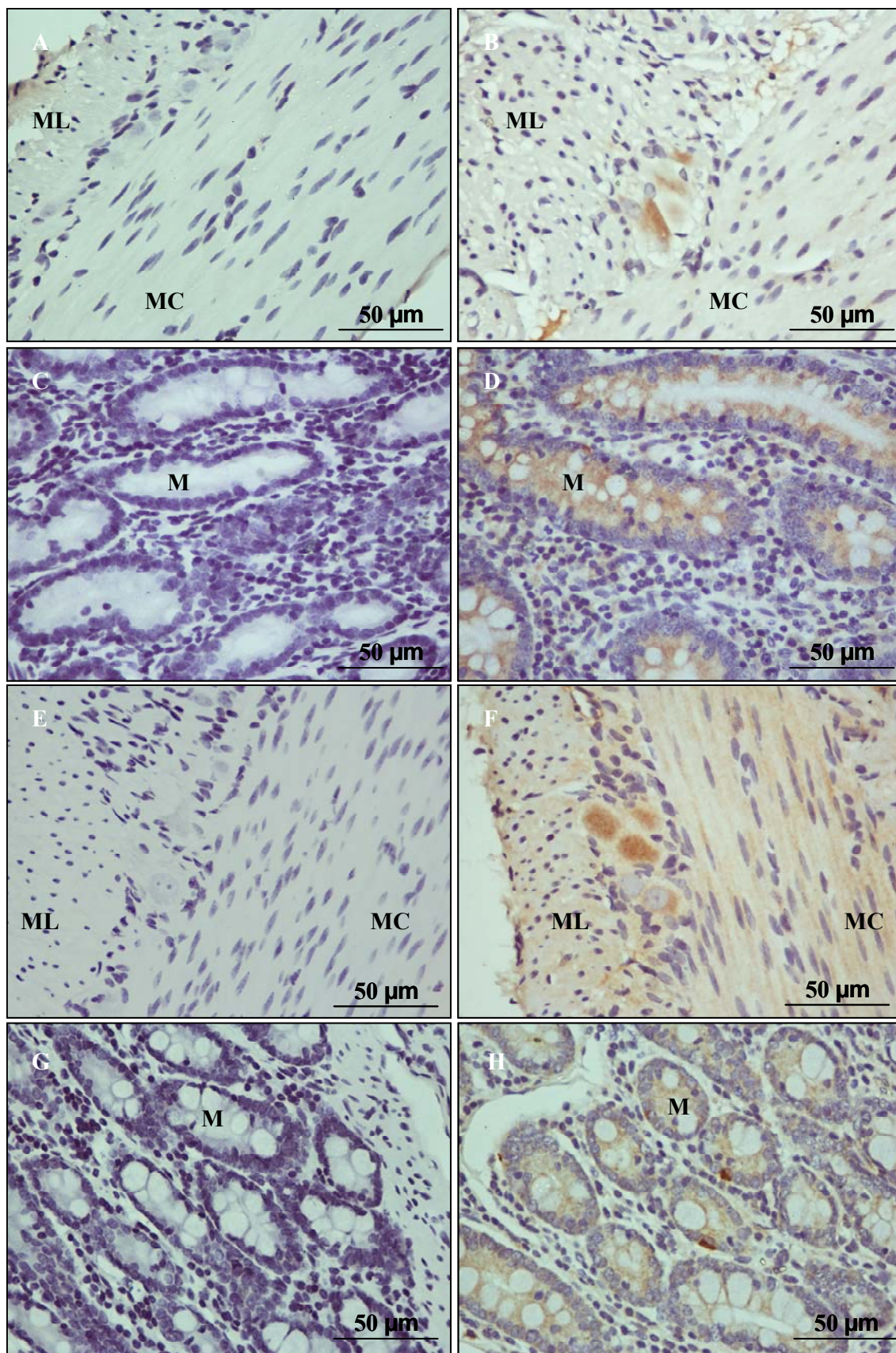


Figura 4.9.2 - Cortes de duodeno de ovejas control incubados con los anticuerpos primarios frente a los receptores EP<sub>1</sub> (B), EP<sub>2</sub> (D), EP<sub>3</sub> (F) y EP<sub>4</sub> (H) y sin ellos (A, C, E y G respectivamente) para comprobar la especificidad de los mismos.

Mediante la técnica de WB, se detectó la expresión de los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> en homogenados de hipotálamo y bulbo raquídeo de ovejas control (Fig. 4.9.3 a 4.9.6 y Tabla 4.9.1). Por otra parte, en estos tejidos y mediante la técnica de IHC, se inmunolocalizaron en neuronas, cuyo citoplasma se observó intensamente teñido (Figs. 4.9.7 a 4.9.10). Las neuronas que se observaban teñidas para los distintos receptores EPs no tenían ninguna distribución específica, sino que se encontraban como neuronas aisladas repartidas de forma uniforme por todo el parénquima hipotalámico y del bulbo raquídeo (Figs. 4.9.7 a 4.9.10).

Las técnicas de WB e IHC no mostraron cambios en la expresión de los receptores EPs en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja tras el tratamiento con LPS (Figs. 4.9.3 a 4.9.10 y Tabla 4.9.1).

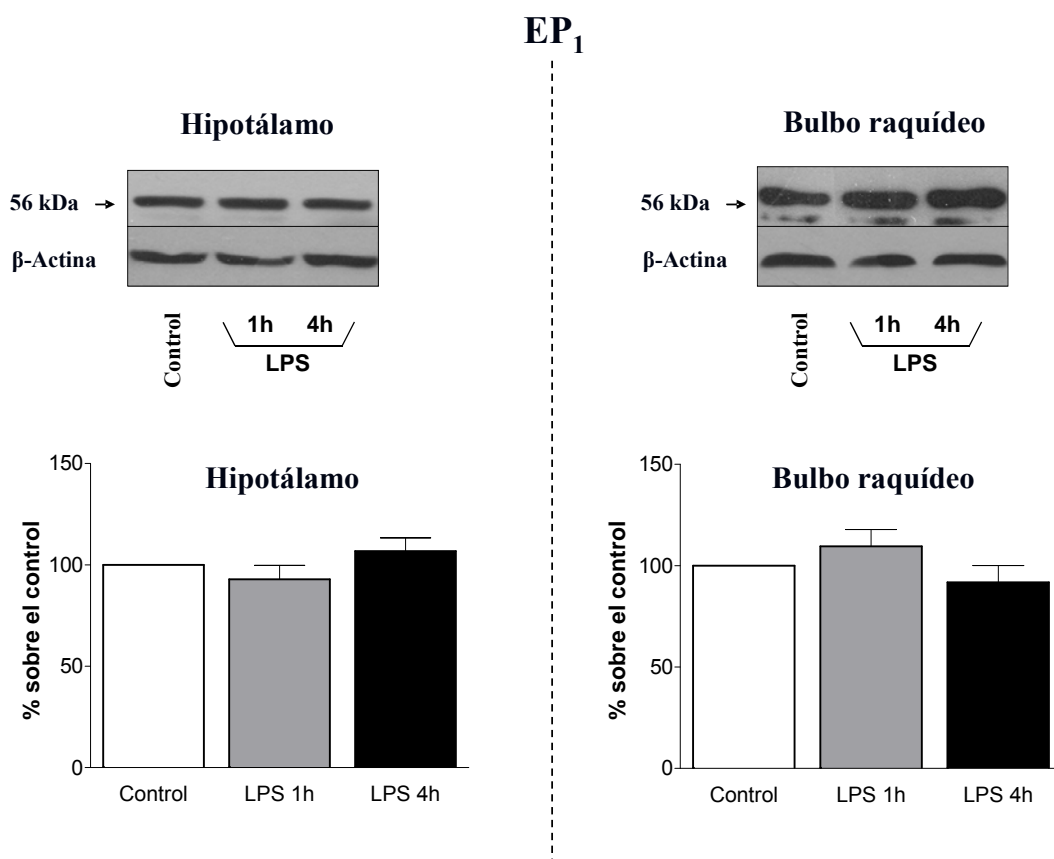


Figura 4.9.3 - Expresión del receptor EP<sub>1</sub> en homogenados de hipotálamo y bulbo raquídeo de ovejas control o tratadas con LPS durante 1 ó 4 horas. El WB mostró una banda de 56 kDa. El tratamiento con LPS no indujo cambios en la expresión del receptor. La β-actina se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.

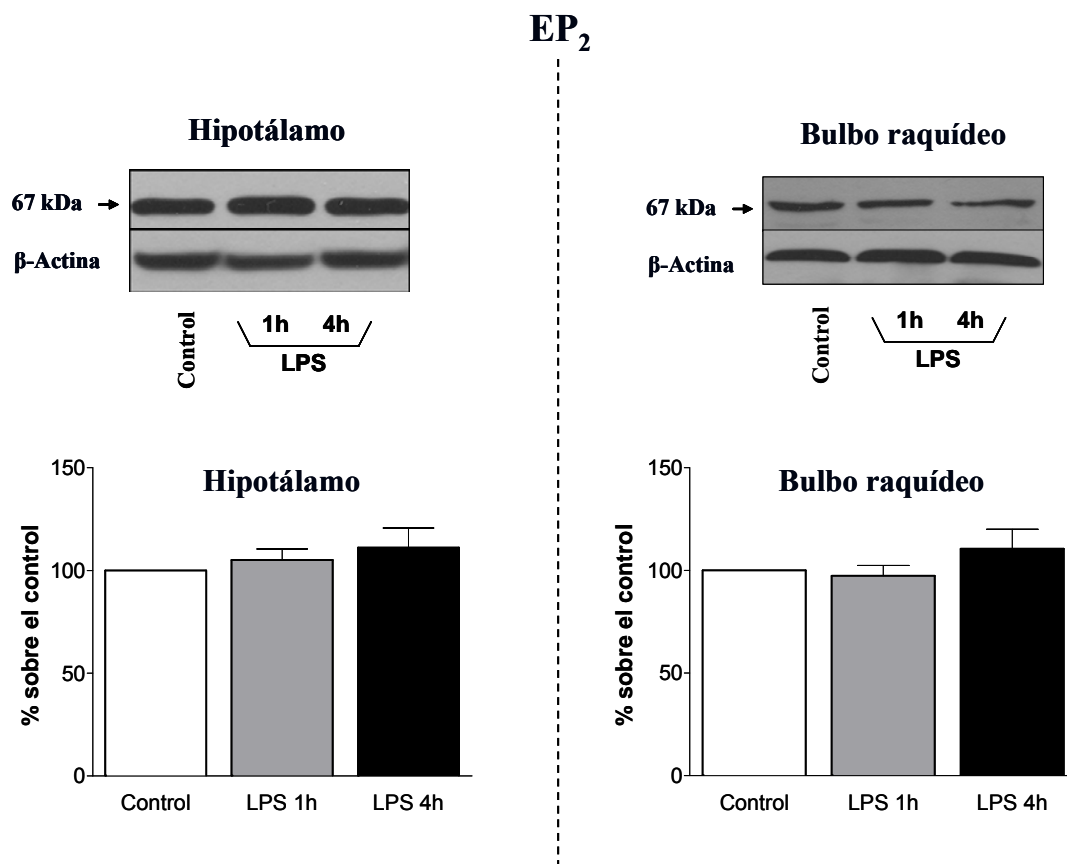


Figura 4.9.4 - Expresión del receptor EP<sub>2</sub> de la PGE<sub>2</sub> en homogenados de hipotálamo y bulbo raquídeo de ovejas control o tratadas con LPS durante 1 ó 4 horas. El WB mostró una banda de 67 kDa. El tratamiento con LPS no indujo cambios en la expresión del receptor. La β-actina se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.



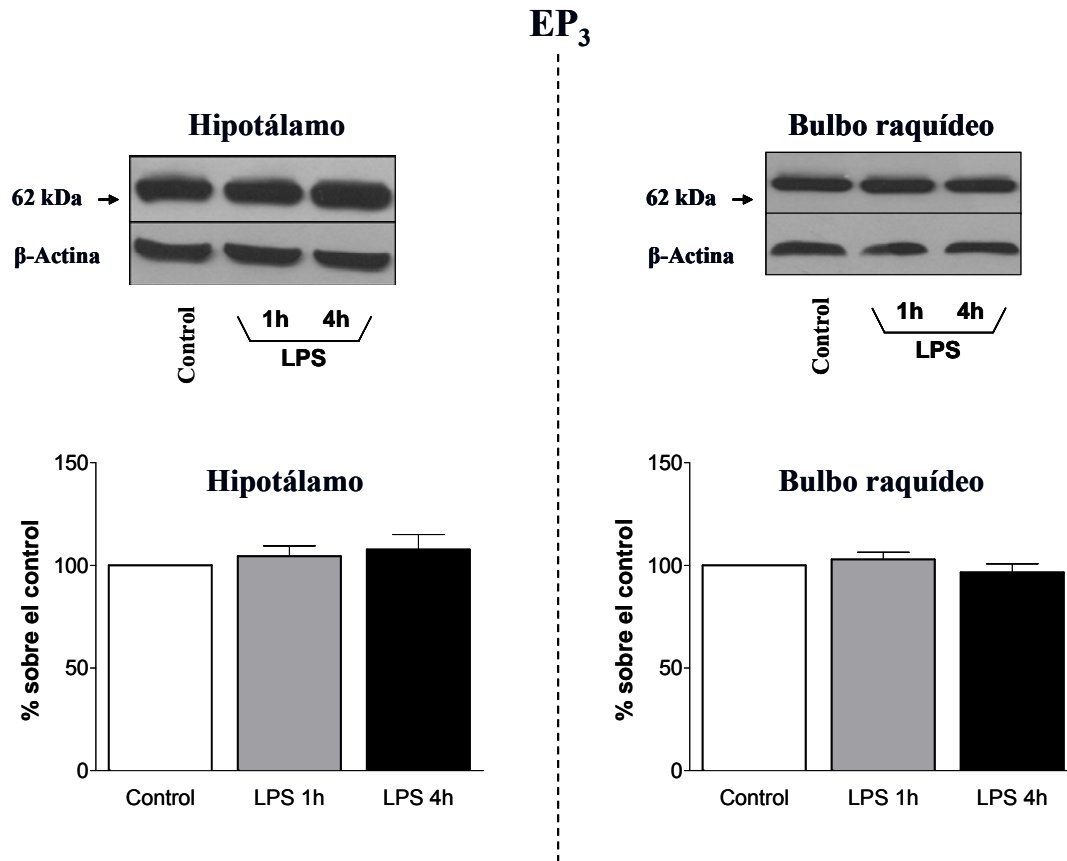


Figura 4.9.5 - Expresión del receptor EP<sub>3</sub> de la PGE<sub>2</sub> en homogenados de hipotálamo y bulbo raquídeo de ovejas control o tratadas con LPS durante 1 ó 4 horas. El WB mostró una banda de 62 kDa. El tratamiento con LPS no indujo cambios en la expresión del receptor. La β-actina se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.

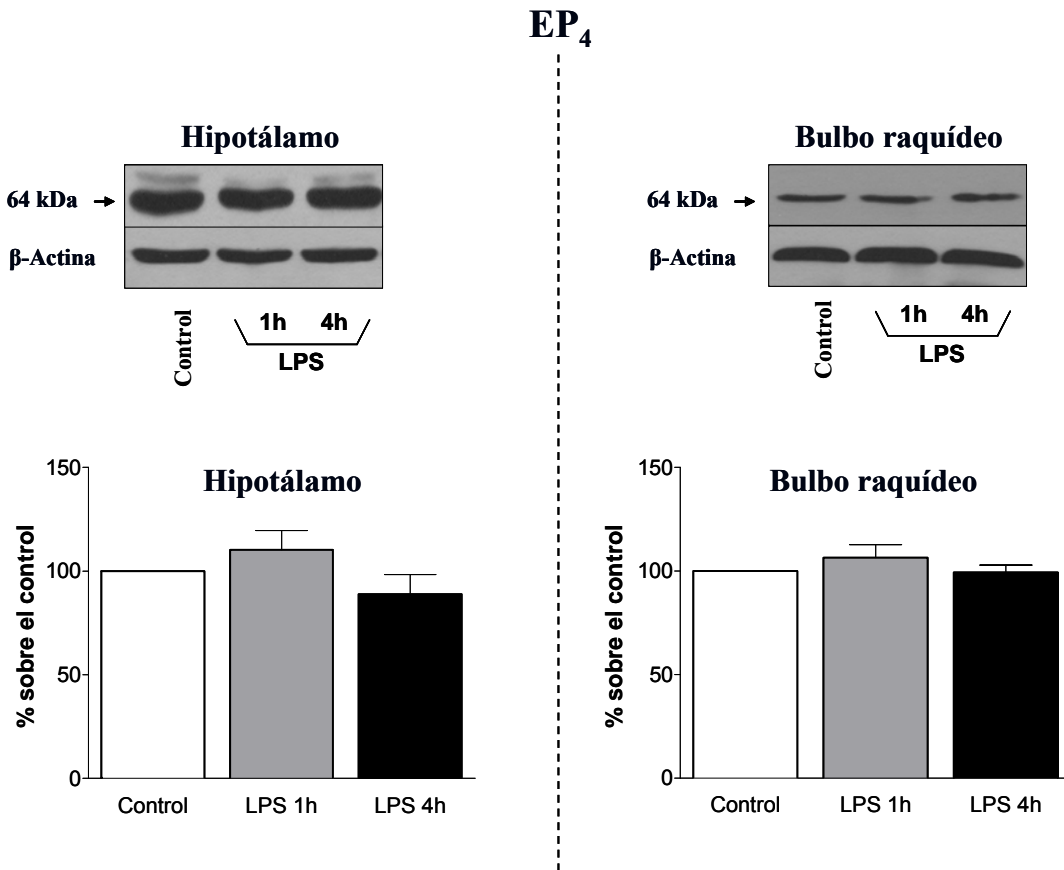


Figura 4.9.6 - Expresión del receptor EP<sub>4</sub> de la PGE<sub>2</sub> en homogenados de hipotálamo y bulbo raquídeo de ovejas control o tratadas con LPS durante 1 ó 4 horas. El WB mostró una banda de 64 kDa. El tratamiento con LPS no indujo cambios en la expresión del receptor. La β-actina se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control..

	Hipotálamo			Bulbo raquídeo		
	Control	LPS 1h	LPS 4h	Control	LPS 1h	LPS 4h
EP <sub>1</sub>	100 %	92,92 ± 6,83 %	106,76 ± 6,57 %	100 %	109,55 ± 8,29 %	91,74 ± 8,35 %
EP <sub>2</sub>	100 %	105,15 ± 5,34 %	111,12 ± 9,55 %	100 %	97,39 ± 5,04 %	110,52 ± 9,49 %
EP <sub>3</sub>	100 %	104,42 ± 5,11 %	107,74 ± 7,29 %	100 %	102,93 ± 3,46 %	96,62 ± 4,16 %
EP <sub>4</sub>	100 %	110,23 ± 9,31 %	88,88 ± 9,43 %	100 %	106,38 ± 6,41 %	99,25 ± 3,55 %

Tabla 4.9.1 - Efecto del tratamiento con LPS sobre la expresión de los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> de la PGE<sub>2</sub> en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja. La cuantificación de las bandas de los animales tratados con LPS se expresa como porcentaje respecto de los animales control (100%).



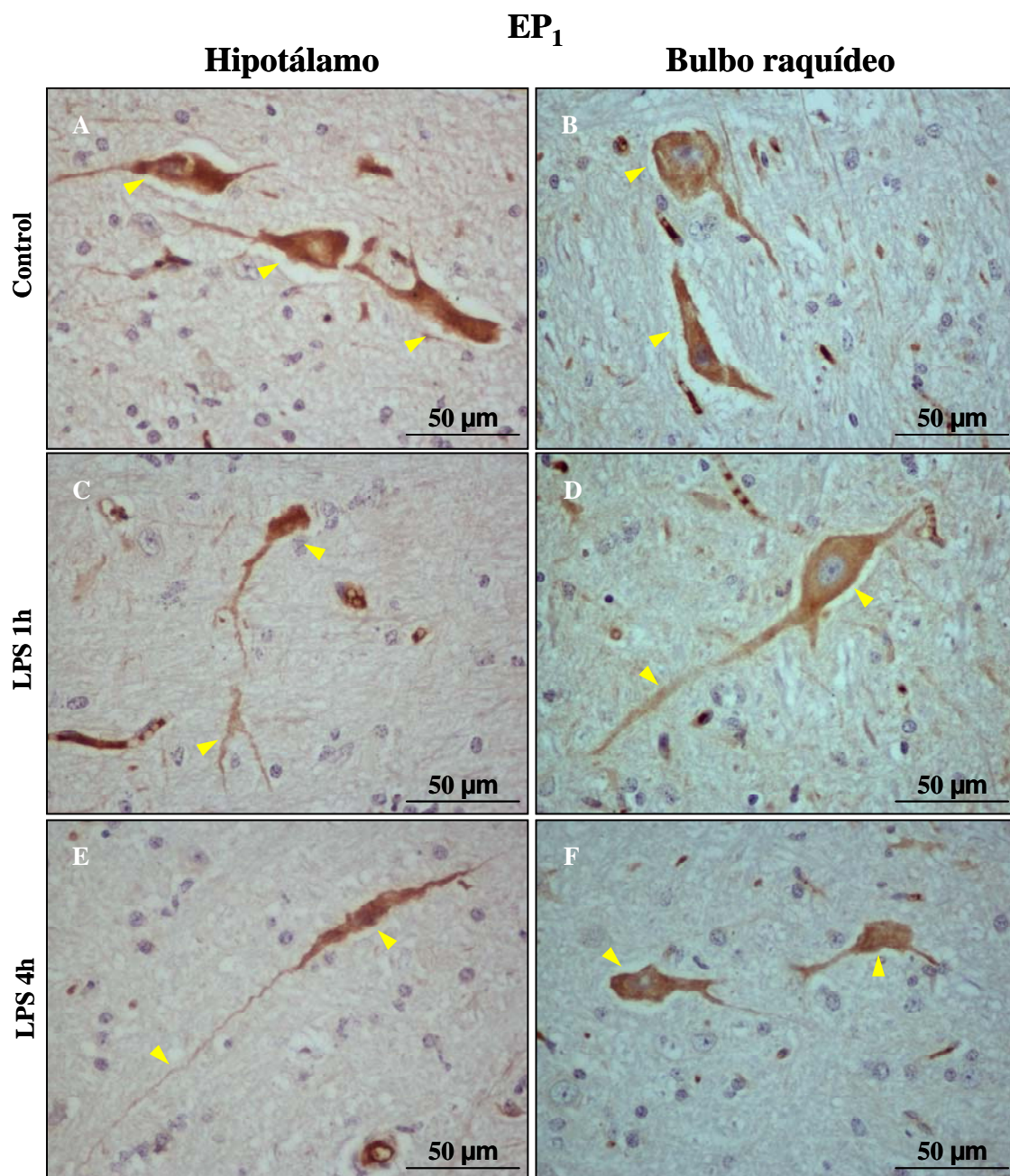


Figura 4.9.7 - Localización del receptor EP<sub>1</sub> en el hipotálamo (A, C y E) y bulbo raquídeo (B, D y F) de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). Todos los receptores EP se expresaron en el citoplasma de neuronas (puntas de flechas amarillas).

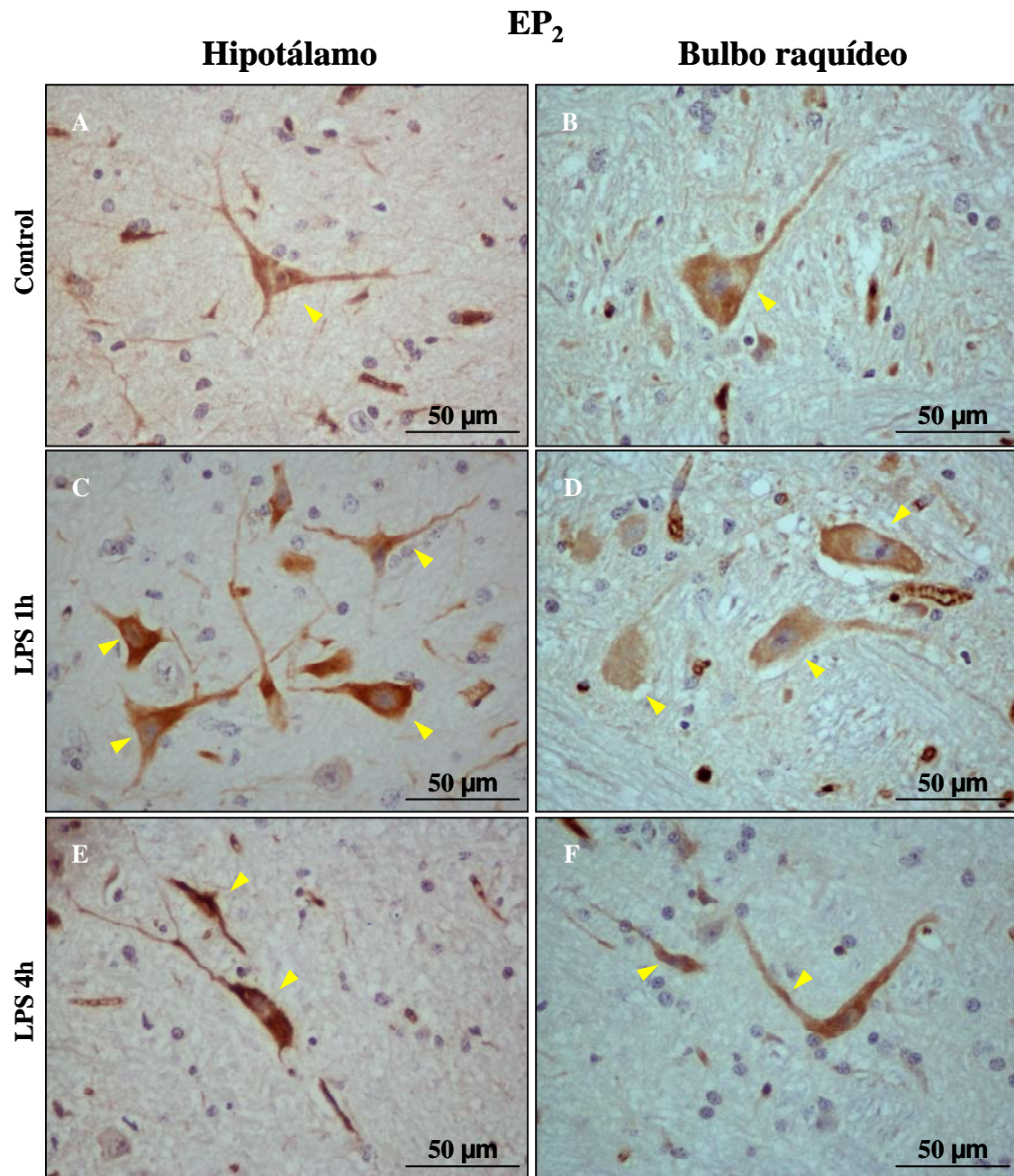


Figura 4.9.8 - Localización del receptor EP<sub>2</sub> en el hipotálamo (A, C y E) y bulbo raquídeo (B, D y F) de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). Todos los receptores EP se expresaron en el citoplasma de neuronas (puntas de flechas amarillas).



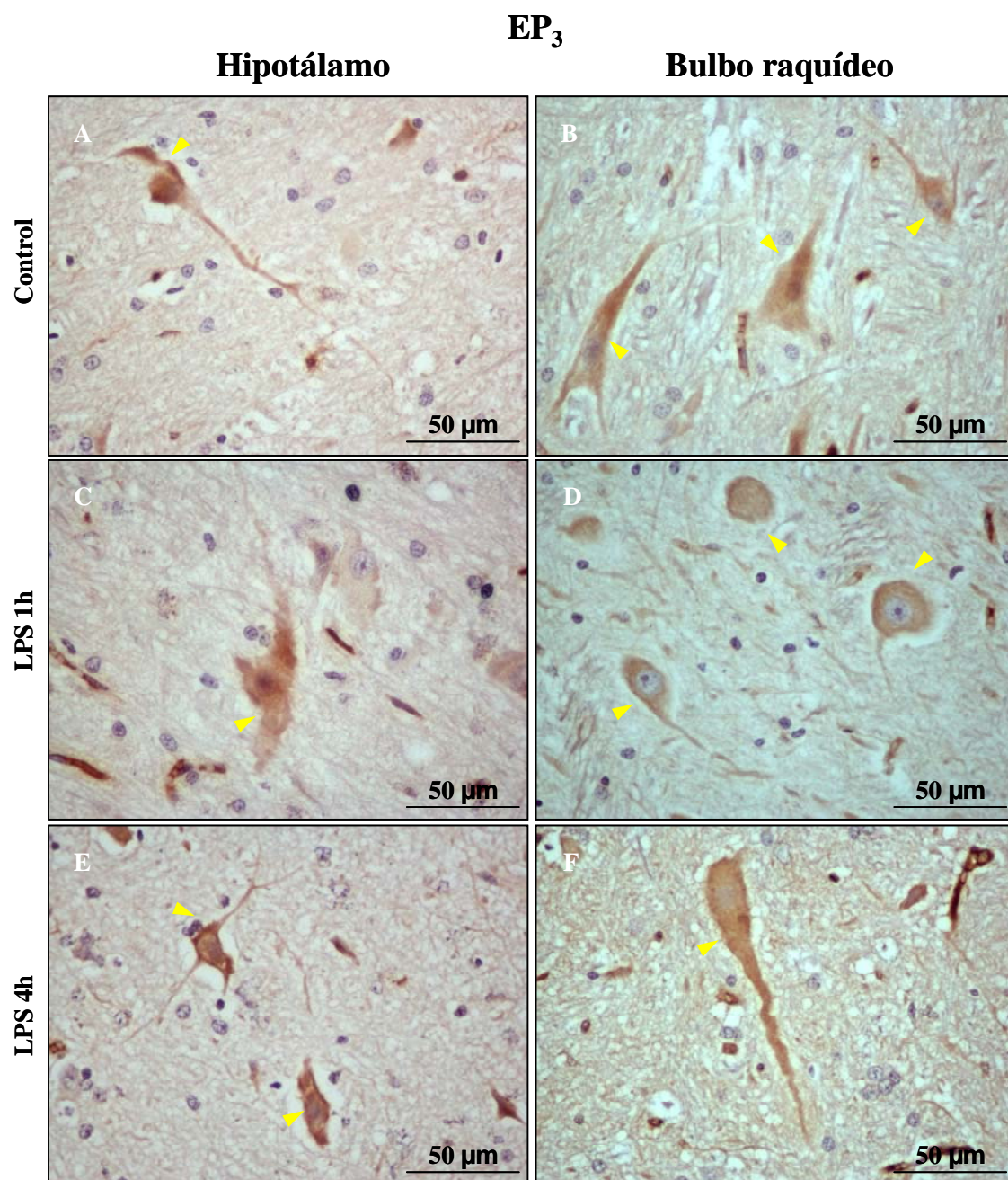


Figura 4.9.9 - Localización del receptor EP<sub>3</sub> en el hipotálamo (A, C y E) y bulbo raquídeo (B, D y F) de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). Todos los receptores EP se expresaron en el citoplasma de neuronas (puntas de flechas amarillas).

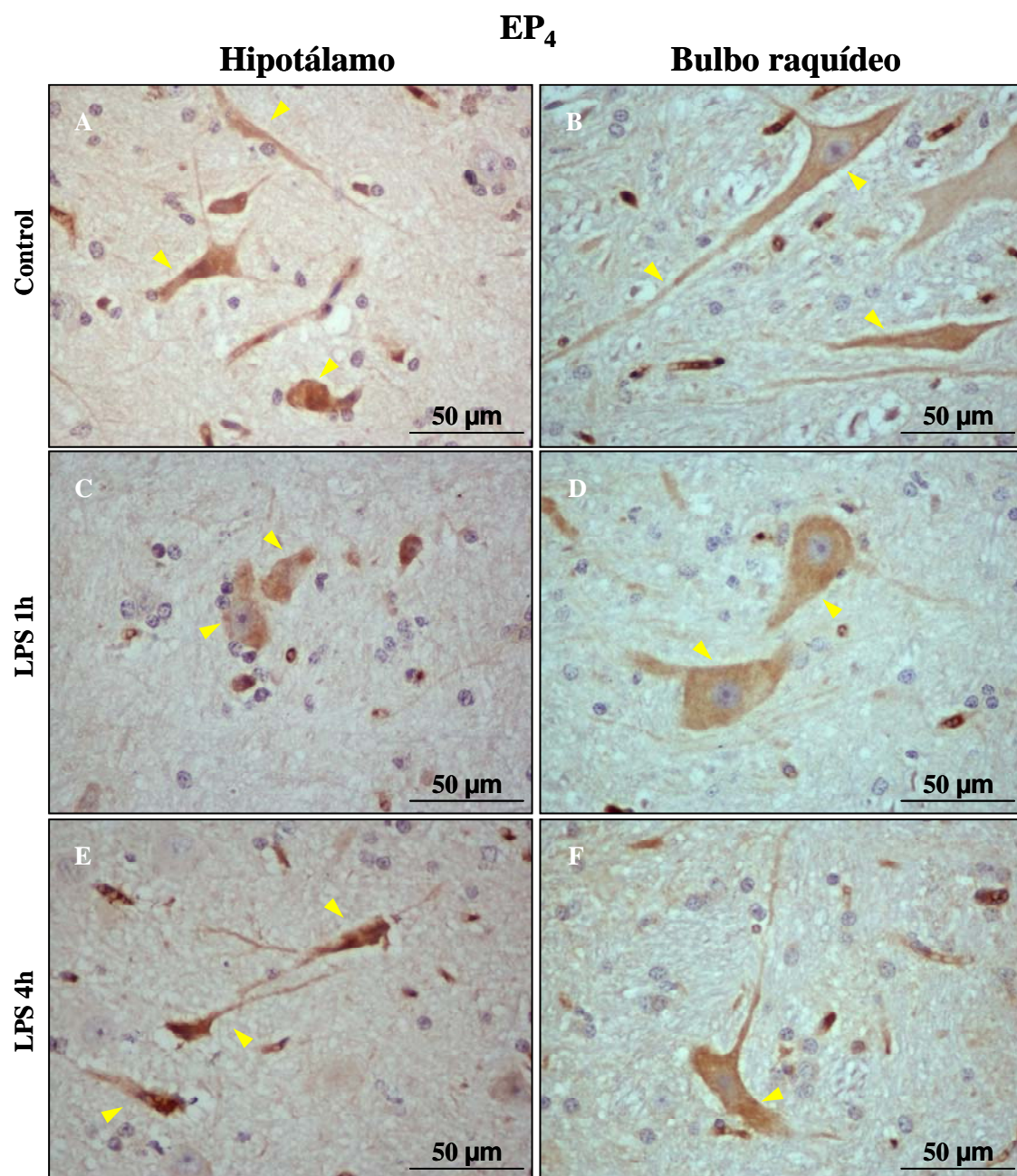


Figura 4.9.10 - Localización del receptor EP<sub>4</sub> en el hipotálamo (A, C y E) y bulbo raquídeo (B, D y F) de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). Todos los receptores EP se expresaron en el citoplasma de neuronas (puntas de flechas amarillas).

#### 4.10 EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs) EN EL TRACTO GI DE LA OVEJA

Mediante la técnica de **WB** se comprobó que todos los receptores EP de la PGE<sub>2</sub> se expresaban en homogenados de rumen, antro gástrico y duodeno de ovejas control (Figs. 4.10.1 a 4.10.4 y Tablas 4.10.1 a 4.10.4).

Por medio de la técnica de **IHC** se detectó que los **cuatro** subtipos de receptores de la PGE<sub>2</sub> se expresaban en el citoplasma de las neuronas de los plexos nerviosos mientérico y submucoso de todos los tramos GI estudiados (Fig. 4.10.6; Fig. 4.10.7; Fig. 4.10.8 C, D y F; Fig. 4.10.9 B, C, D y F; Fig. 4.10.10 B-F; Fig. 4.10.11; Fig. 4.10.12 C y D; Fig. 4.10.13 C y D).

En el caso del receptor **EP<sub>3</sub>**, se observó además una intensa tinción positiva afectando al citoplasma de los miocitos de las capas musculares circular y longitudinal de todos los tejidos GI estudiados (Figs. 4.10.10 y 4.10.11). Ninguno de los otros receptores EPs se localizaron a este nivel.

En el rumen, antro abomasal y duodeno, los receptores **EP<sub>2</sub>** y **EP<sub>4</sub>** se localizaron en la mucosa GI. En el rumen, cuyo epitelio es poliestratificado, ambos receptores se localizaron en el citoplasma de las células de los estratos más basales (no cornificados), concretamente en el basal, espinoso y granuloso (Fig. 4.10.8 A y E; Fig. 4.10.12 A y B).

El receptor **EP<sub>2</sub>** se expresó en el citoplasma de las glándulas de la mucosa del antro abomasal (Fig. 4.10.8 B y F) y en el epitelio de revestimiento y criptas de Lieberkühn del duodeno (Fig. 4.10.9 A, C y E).

En el caso del receptor **EP<sub>4</sub>**, se observó expresión en el citoplasma de unas células redondeadas dispersas por la mucosa del antro gástrico (Fig. 4.10.13 A y B) y del duodeno (Fig. 4.10.14 B y E). Además se observó una tinción de tipo apical en los enterocitos de las vellosidades intestinales (Fig. 4.10.14 A y F).

Con el objetivo de valorar en qué zona del tejido predominaba el receptor EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub>, se tomaron muestras de duodeno y se separó la capa mucosa del resto del tejido mediante raspado. Se realizaron WB utilizando las dos partes del duodeno así separadas. De esta forma, se comprobó que la expresión del receptor EP<sub>2</sub> era más abundante en los homogenados de mucosa aislada, mientras que no se encontraron diferencias de expresión del receptor EP<sub>4</sub> entre la capa mucosal aislada y el resto del tejido (Fig. 4.10.5).

Las técnicas de WB e IHC no mostraron cambios en la expresión de los receptores EPs en el rumen, antro gástrico y duodeno de la oveja tras el tratamiento con LPS (Figs. 4.10.1 a 4.10.14 y Tablas 4.10.1 a 4.10.4).

			<b>EP<sub>1</sub></b>	<b>EP<sub>2</sub></b>	<b>EP<sub>3</sub></b>	<b>EP<sub>4</sub></b>
<b>MUCOSA</b>	<b>Epitelio</b>	Rumen	---	<b>Estratos basales</b> (citoplasma)	---	<b>Estratos basales</b> (citoplasma)
		Antro		<b>Glándulas</b> (citoplasma)		Células <b>redondeadas</b> (citoplasma)
		Intestino		<b>Epitelio de revestimiento y glándulas</b> (citoplasma)		<b>Enterocitos de las vellosidades</b> (tinción apical) Células <b>redondeadas</b>
	<b>Lámina propia</b>	Rumen	---	---	---	---
		Antro				
		Intestino				
	<i>Muscularis mucosae</i>	Rumen	---	---	---	---
		Antro				
		Intestino				
	<b>SM</b>	Rumen	---	---	---	---
		Antro				
		Intestino				
<b>P.S.</b>		Rumen	<b>Sí</b> (Citoplasma)	<b>Sí</b> (Citoplasma)	<b>Sí</b> (Citoplasma)	<b>Sí</b> (Citoplasma)
		Antro				
		Intestino				
<b>MUSCULAR</b>	<b>C</b>	Rumen	---	---	<b>Miocitos</b> (Citoplasma)	---
		Antro				
		Intestino				
	<b>L</b>	Rumen	---	---	<b>Miocitos</b> (Citoplasma)	---
		Antro				
		Intestino				
<b>P.M.</b>		Rumen	<b>Sí</b> (Citoplasma)	<b>Sí</b> (Citoplasma)	<b>Sí</b> (Citoplasma)	<b>Sí</b> (Citoplasma)
		Antro				
		Intestino				
<b>SEROSA</b>		Rumen	---	---	---	---
		Antro				
		Intestino				

SM: Submucosa; P.S.: Plexo submucoso; C: Circular; L: Longitudinal; P.M.: Plexo mientérico.



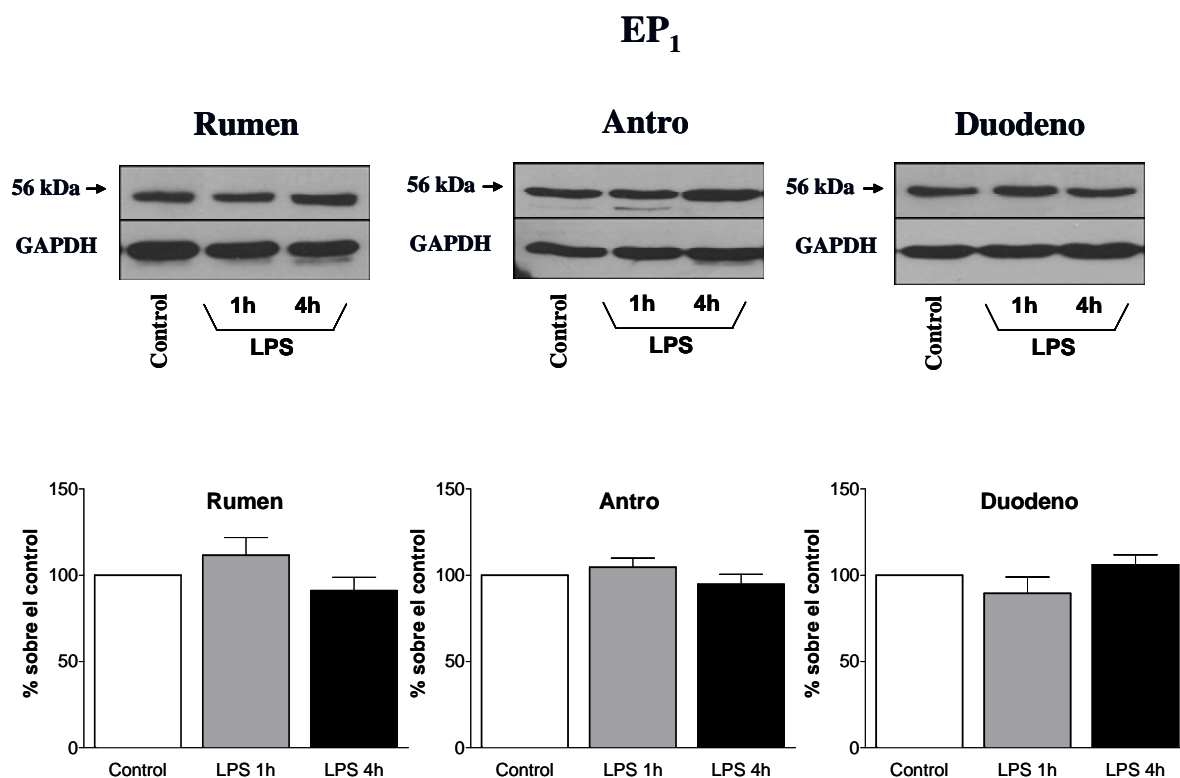


Figura 4.10.1 - Expresión del receptor EP<sub>1</sub> en homogenados de rumen, antro abomasal y duodeno de ovejas control y tratadas con LPS durante 1 y 4 horas. El WB mostró una banda de 56 kDa. El tratamiento con LPS no indujo cambios en la expresión del receptor. El GAPDH se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.

	EP <sub>1</sub>		
	Rumen	Antro	Duodeno
Control	100 %	100 %	100 %
LPS 1h	111,59 ± 10,25 %	104,65 ± 5,26 %	89,49 ± 9,50 %
LPS 4h	91,09 ± 7,65 %	94,78 ± 5,79 %	105,95 ± 5,86 %

Tabla 4.10.1 - Efecto del tratamiento con LPS sobre la expresión del receptor EP<sub>1</sub> de la PGE<sub>2</sub> en el tracto GI de la oveja. La cuantificación de las bandas de los animales tratados con LPS se expresa como porcentaje respecto de los animales control (100%).



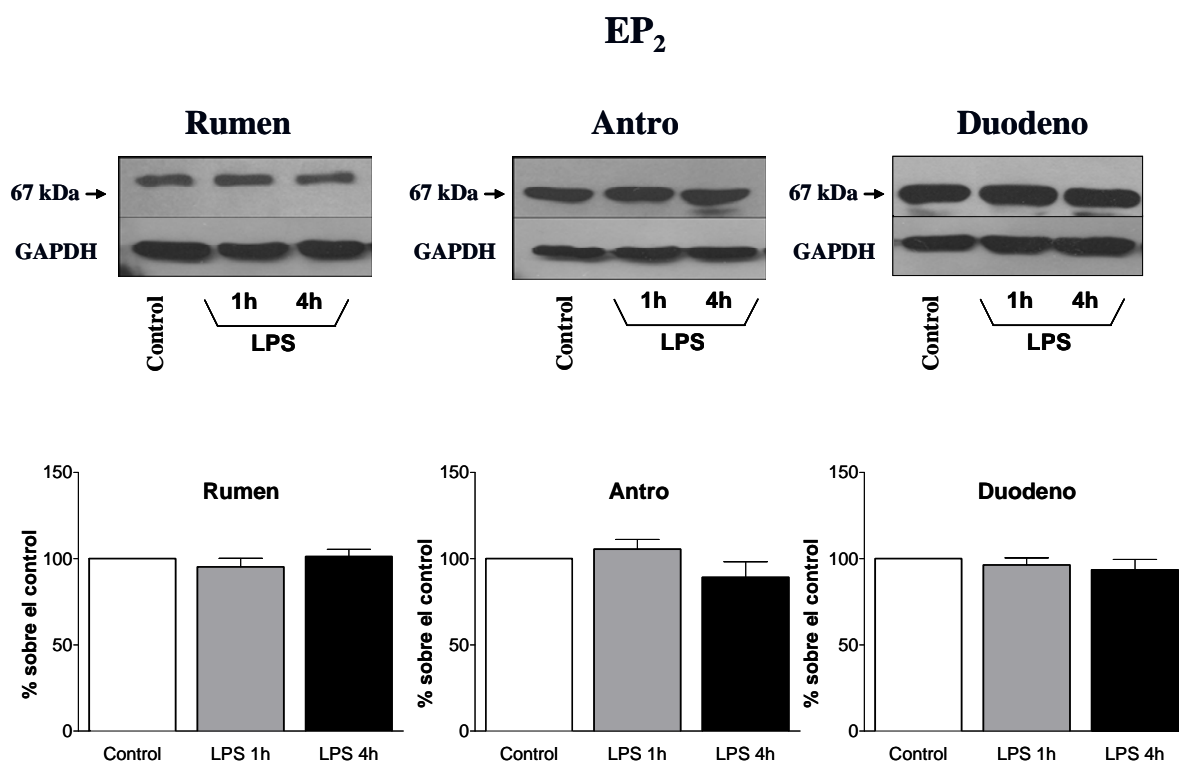


Figura 4.10.2 - Expresión del receptor EP<sub>2</sub> en homogenados de rumen, antro abomasal y duodeno de ovejas control y tratadas con LPS durante 1 y 4 horas. El WB mostró una banda de 67 kDa. El tratamiento con LPS no indujo cambios en la expresión del receptor. El GAPDH se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.

	EP <sub>2</sub>		
	Rumen	Antro	Duodeno
Control	100 %	100 %	100 %
LPS 1h	95,15 ± 5,04 %	105,54 ± 5,62 %	96,26 ± 4,17 %
LPS 4h	101,24 ± 4,21 %	89,19 ± 9,03 %	93,51 ± 6,08 %

Tabla 4.10.2 - Efecto del tratamiento con LPS sobre la expresión del receptor EP<sub>2</sub> de la PGE<sub>2</sub> en el tracto GI de la oveja. La cuantificación de las bandas de los animales tratados con LPS se expresa como porcentaje respecto de los animales control (100%).

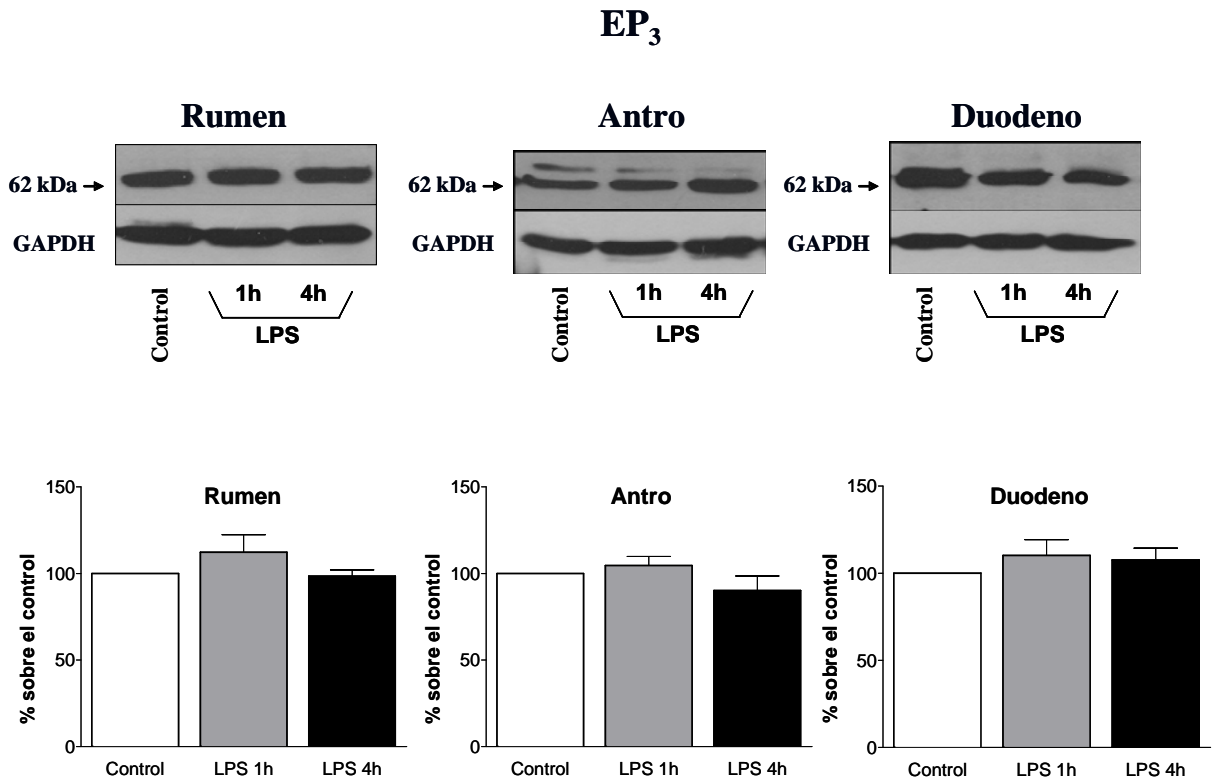


Figura 4.10.3 - Expresión del receptor EP<sub>3</sub> en homogenados de rumen, antro abomasal y duodeno de ovejas control y tratadas con LPS durante 1 y 4 horas. El WB mostró una banda de 62 kDa. El tratamiento con LPS no indujo cambios en la expresión del receptor. El GAPDH se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.

	EP <sub>3</sub>		
	Rumen	Antro	Duodeno
Control	100 %	100 %	100 %
LPS 1h	112,22 ± 10,17 %	104,57 ± 5,28 %	110,25 ± 9,11 %
LPS 4h	98,49 ± 3,51 %	90,19 ± 8,37 %	107,65 ± 6,78 %

Tabla 4.10.3 - Efecto del tratamiento con LPS sobre la expresión del receptor EP<sub>3</sub> de la PGE<sub>2</sub> en el tracto GI de la oveja. La cuantificación de las bandas de los animales tratados con LPS se expresa como porcentaje respecto de los animales control (100%).

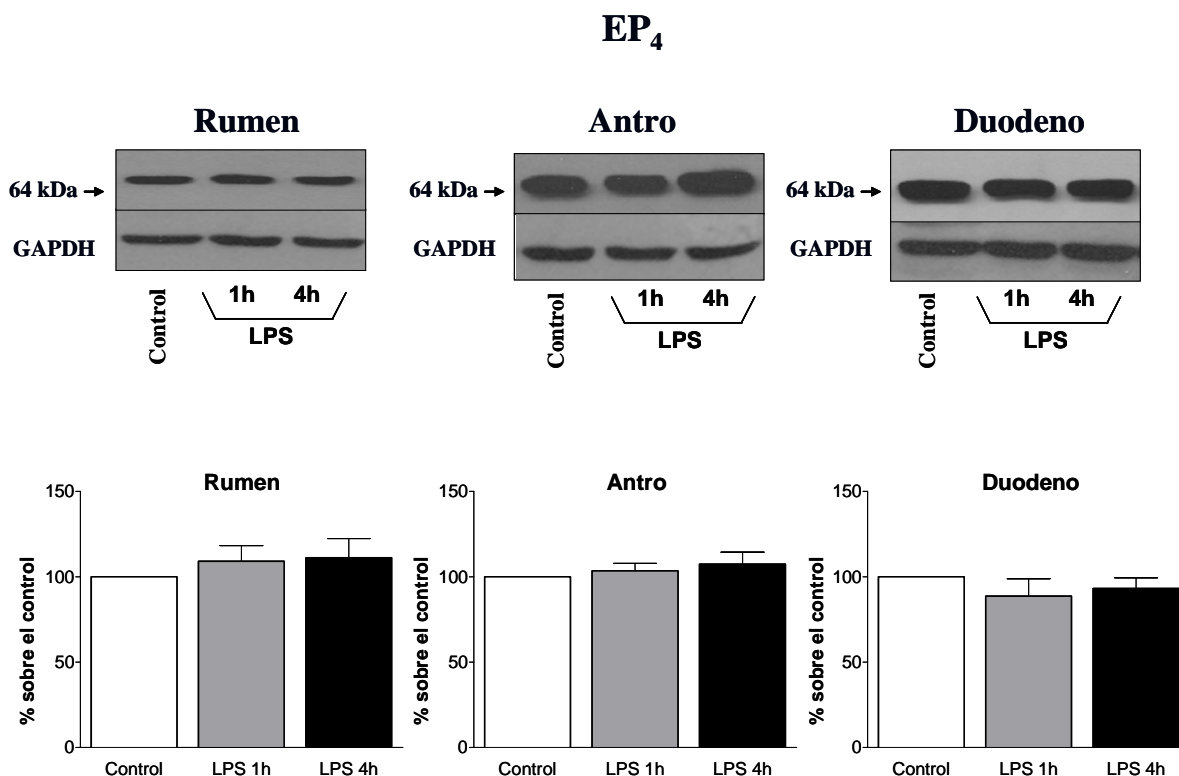


Figura 4.10.4 - Expresión del receptor EP<sub>4</sub> en homogenados de rumen, antro abomasal y duodeno de ovejas control y tratadas con LPS durante 1 y 4 horas. El WB mostró una banda de 64 kDa. El tratamiento con LPS no indujo cambios en la expresión del receptor. El GAPDH se utilizó como control de carga en cada calle. La cuantificación de las bandas se expresa como porcentaje respecto de los animales control.

	EP <sub>4</sub>		
	Rumen	Antro	Duodeno
Control	100 %	100 %	100 %
LPS 1h	109,03 ± 9,28 %	103,46 ± 4,45 %	88,69 ± 10,17 %
LPS 4h	111,23 ± 11,16 %	107,38 ± 7,03 %	93,16 ± 6,28 %

Tabla 4.10.4 - Efecto del tratamiento con LPS sobre la expresión del receptor EP<sub>4</sub> de la PGE<sub>2</sub> en el tracto GI de la oveja. La cuantificación de las bandas de los animales tratados con LPS se expresa como porcentaje respecto de los animales control (100%).

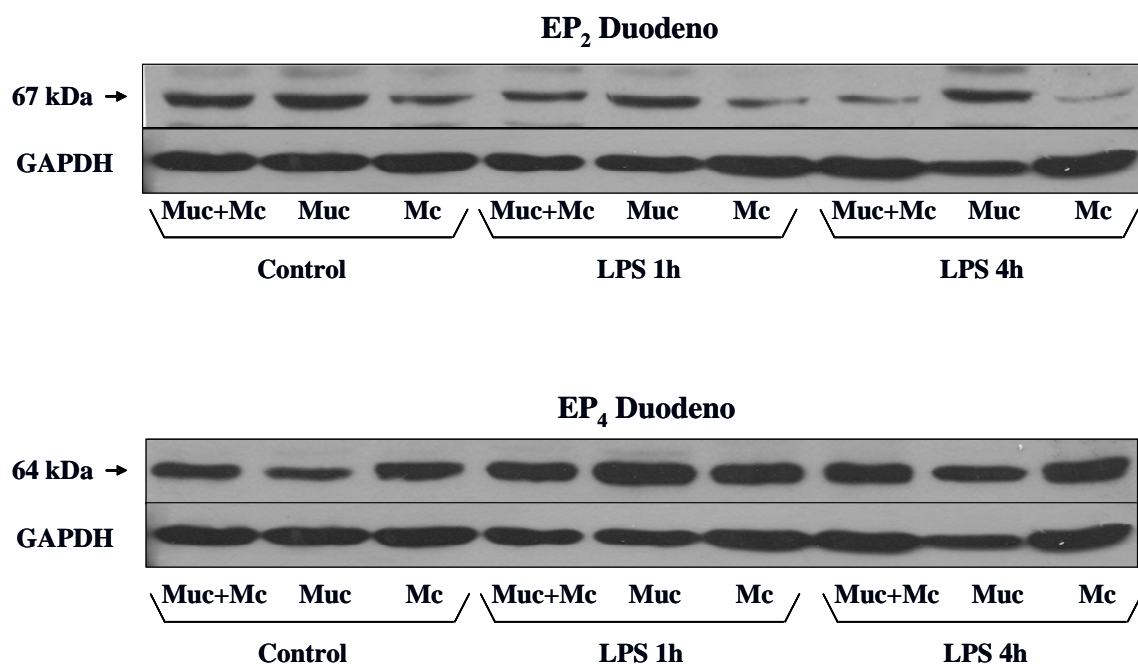


Figura 4.10.5 - Expresión de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> en el duodeno de las ovejas control y tratadas con LPS durante 1 ó 4 horas. El WB mostró unas bandas de 67 y 64 kDa, respectivamente. El receptor EP<sub>2</sub> era más abundante en los homogenados de mucosa aislada, mientras que no se encontraron diferencias de expresión del receptor EP<sub>4</sub> entre la capa mucosal aislada y el resto del tejido. El GAPDH se utilizó como control de carga en cada calle. Muc+Mc: muestras de duodeno. Muc: muestras de mucosa duodenal aislada. Mc: muestras duodenales con las capas musculares lisas y plexos entéricos, tras retirar la capa mucosa.

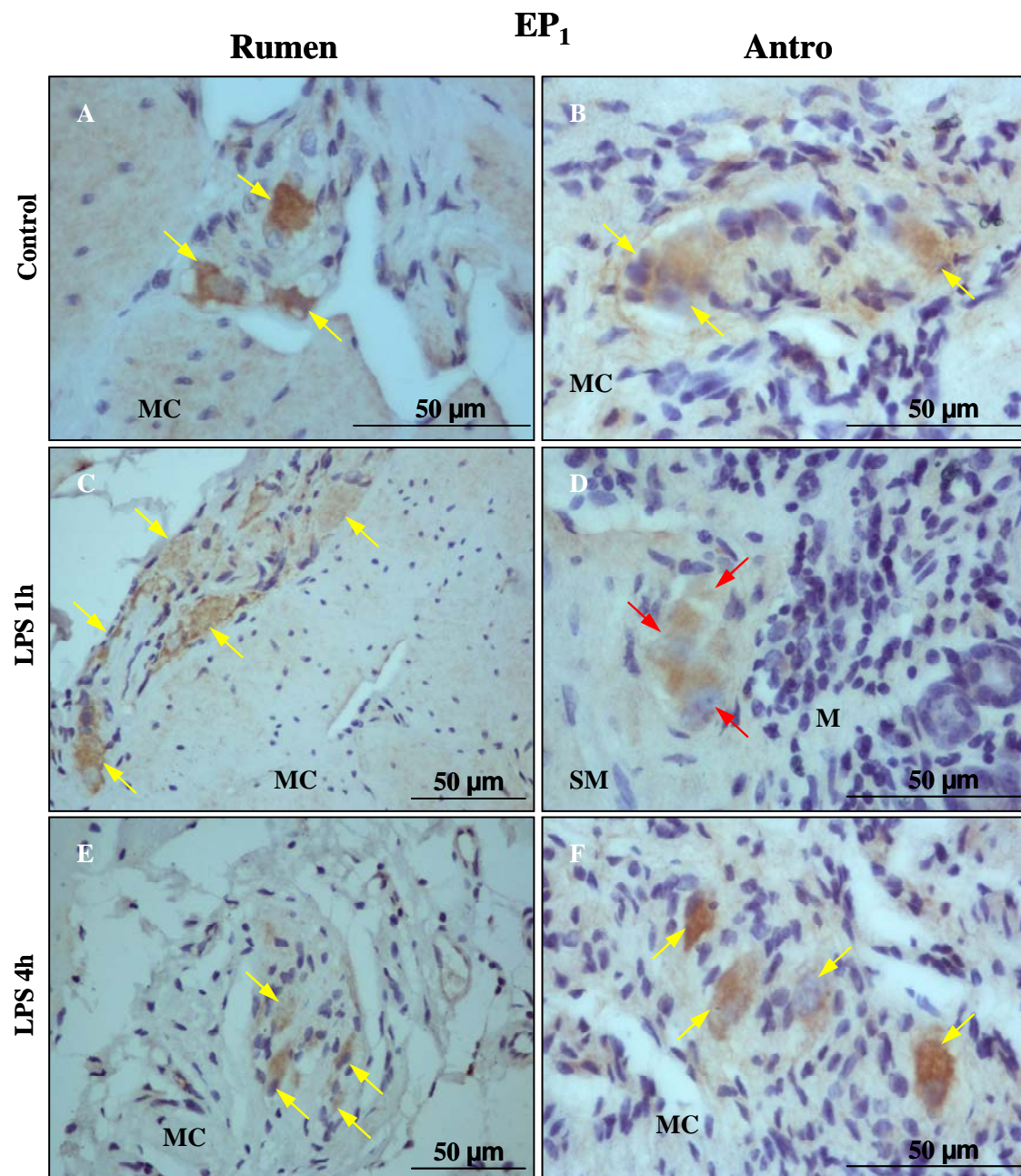


Figura 4.10.6 - Localización del receptor EP<sub>1</sub> en el rumen (A, C, E) y antro abomasal (B, D, F) de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). El receptor EP<sub>1</sub> se expresó en el citoplasma de neuronas de los plexos mientérico (flechas amarillas) y submucoso (flechas rojas). El LPS no modificó la expresión del receptor. M: mucosa. SM: submucosa. MC: muscular circular.



## EP<sub>1</sub> Duodeno

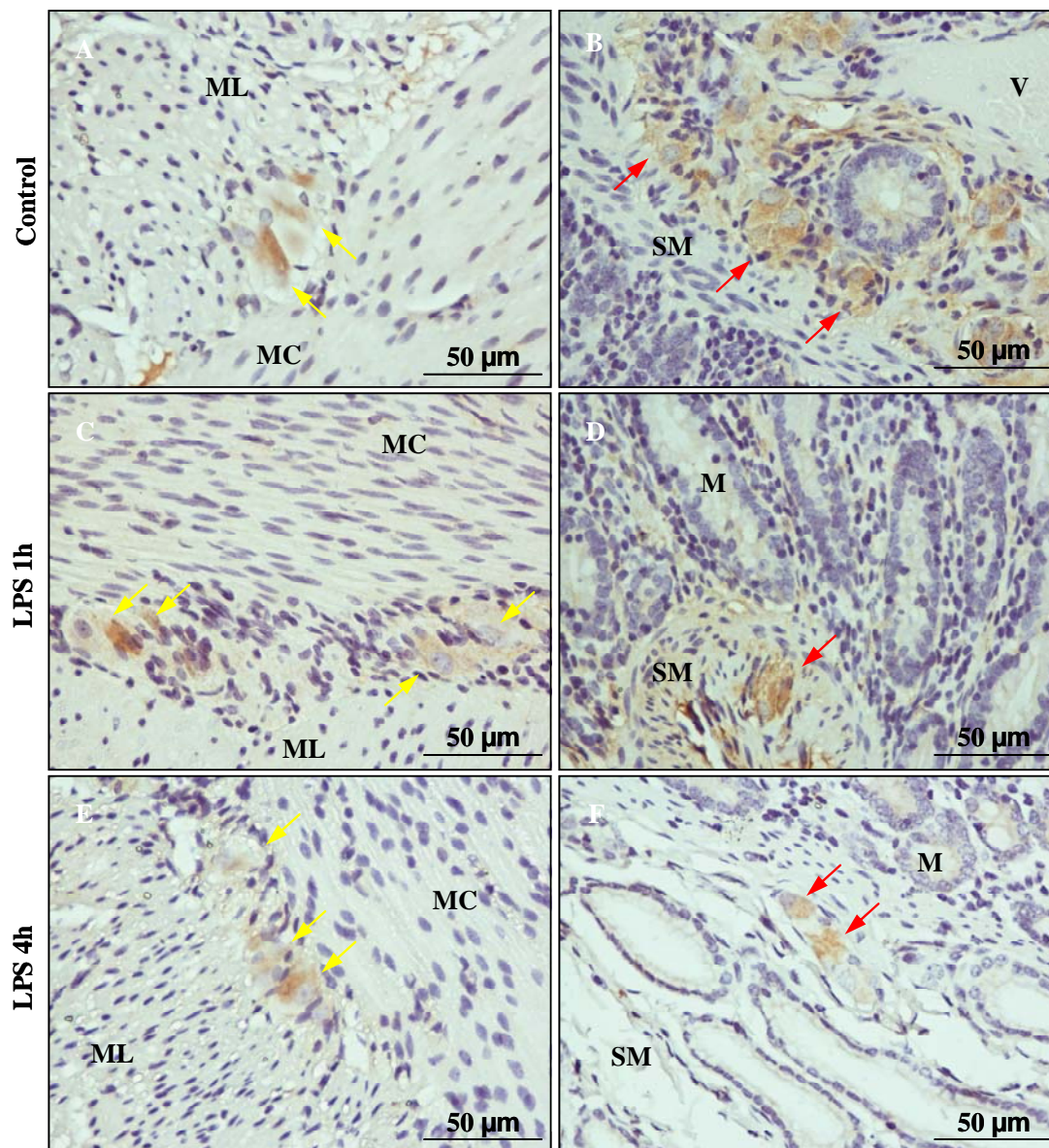


Figura 4.10.7 - Localización del receptor EP<sub>1</sub> en el duodeno de ovejas control (A y B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C y D) ó 4 horas (E y F). A, C y E: Tinción en neuronas del plexo mientérico (flechas amarillas). B, D y F: Tinción en neuronas del plexo submucoso (flechas rojas). M: mucosa. SM: submucosa. MC: muscular circular. ML: muscular longitudinal. V: vaso sanguíneo.

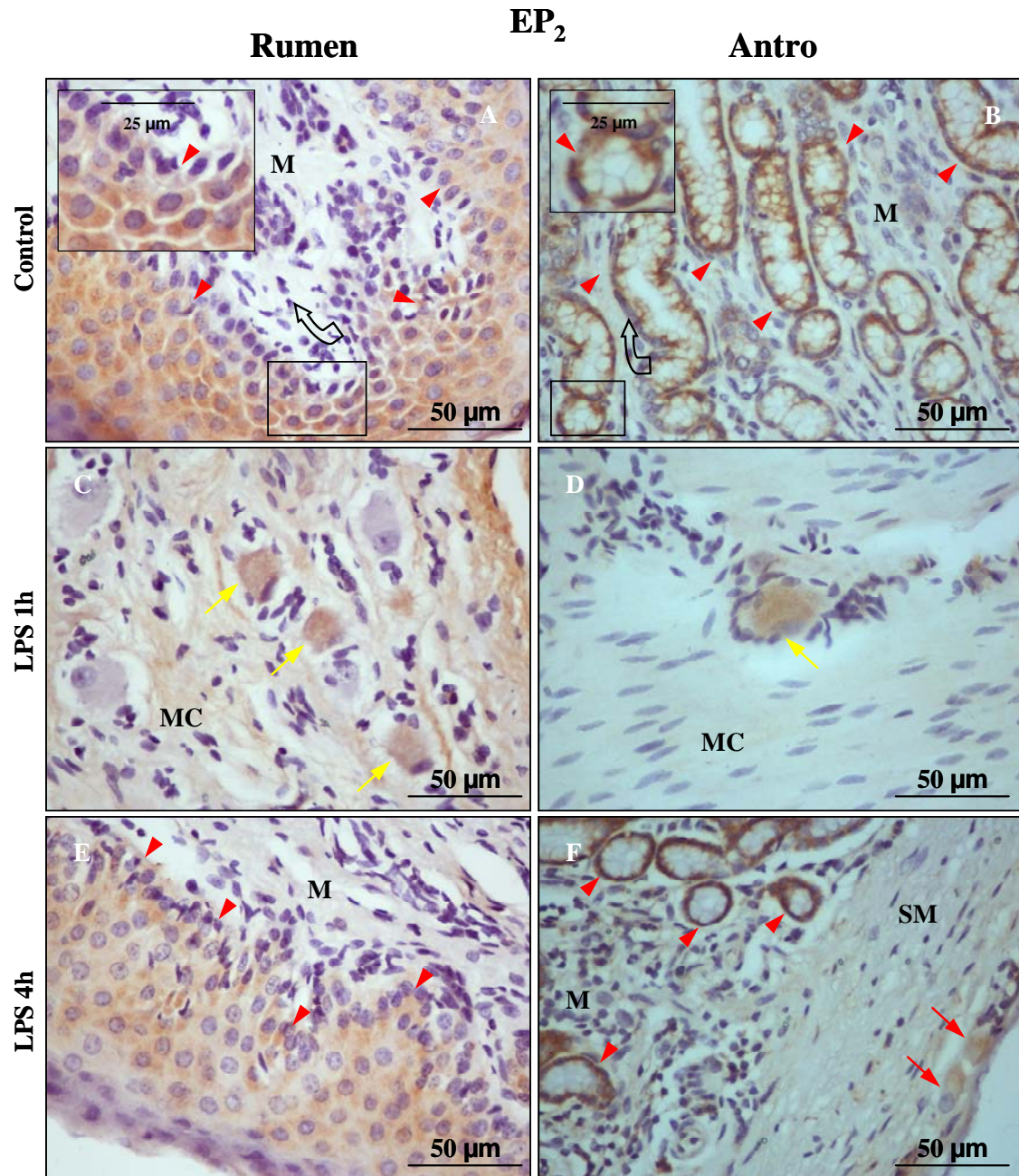


Figura 4.10.8 - Localización del receptor EP<sub>2</sub> en el rumen (A, C, E) y en el antro gástrico (B, D, F) de ovejas control (A, B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C, D) ó 4 horas (E, F). El tratamiento con LPS no modificó la expresión descrita en los tejidos control. A y E: Tinción de la mucosa del rumen, concretamente de los estratos más basales, no cornificados (puntas de flechas rojas). B: Tinción de las glándulas de la mucosa del antro gástrico (puntas de flechas rojas). C y D: Tinción citoplasmática de neuronas mientéricas (flechas amarillas). F: Tinción de glándulas de la mucosa del antro y tinción citoplasmática de neuronas submucosas (flechas rojas). M: mucosa. SM: submucosa. MC: músculo circular. ML: músculo longitudinal.



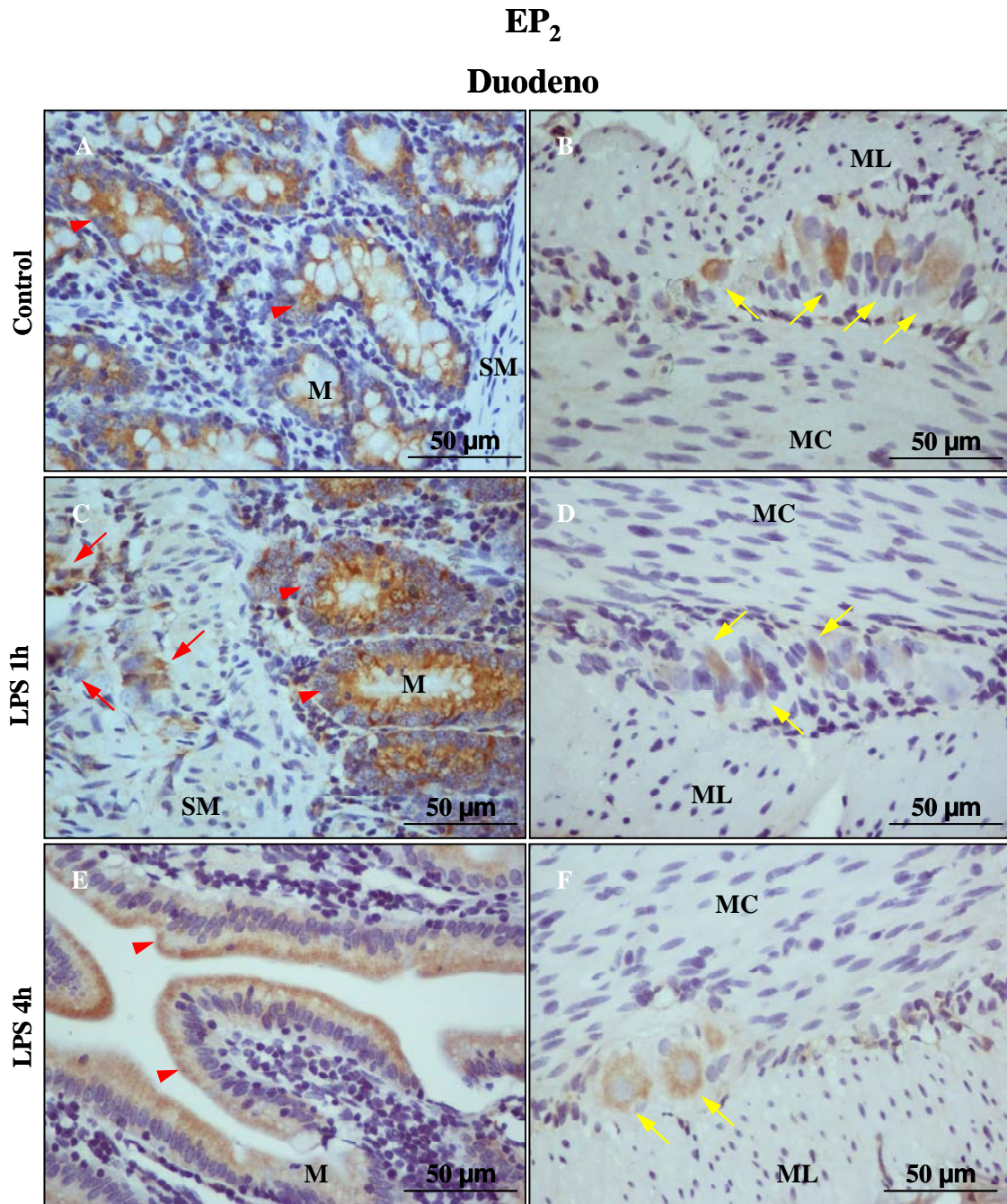


Figura 4.10.9 - Localización del receptor EP<sub>2</sub> en el duodeno de ovejas control (A, B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C, D) ó 4 horas (E, F). El tratamiento con LPS no modificó la expresión descrita en los tejidos control. El receptor se expresó en el epitelio de revestimiento y criptas de Lieberkühn (puntas de flechas rojas). Flechas amarillas: Tinción citoplasmática de neuronas del plexo mientérico. Flechas rojas: Tinción citoplasmática de neuronas del plexo submucoso. M: mucosa. SM: submucosa. MC: muscular circular. ML: muscular longitudinal.



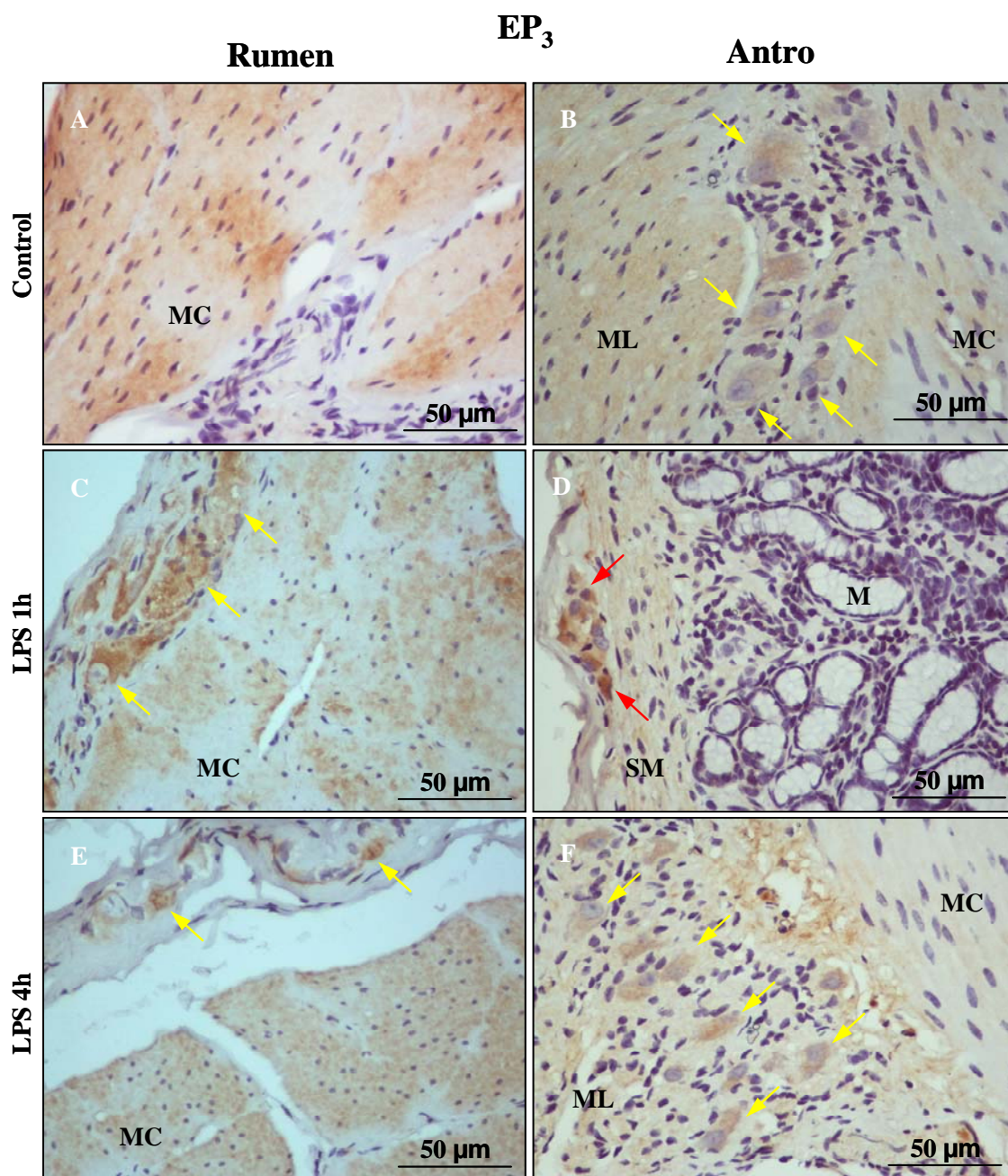


Figura 4.10.10 - Localización del receptor  $EP_3$  en el rumen (A, C, E) y en el antro gástrico (B, D, F) de ovejas control (A, B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C, D) ó 4 horas (E, F). El LPS no indujo cambios en la expresión del receptor  $EP_3$  descrita en los tejidos control. Tinción citoplasmática de los miocitos de las capas musculares lisas circular y longitudinal (A, B, C, E y F), de neuronas mientéricas (flechas amarillas) y submucosas (flechas rojas). M: mucosa. SM: submucosa. MC: muscular circular. ML: muscular longitudinal.

### EP<sub>3</sub> Duodeno

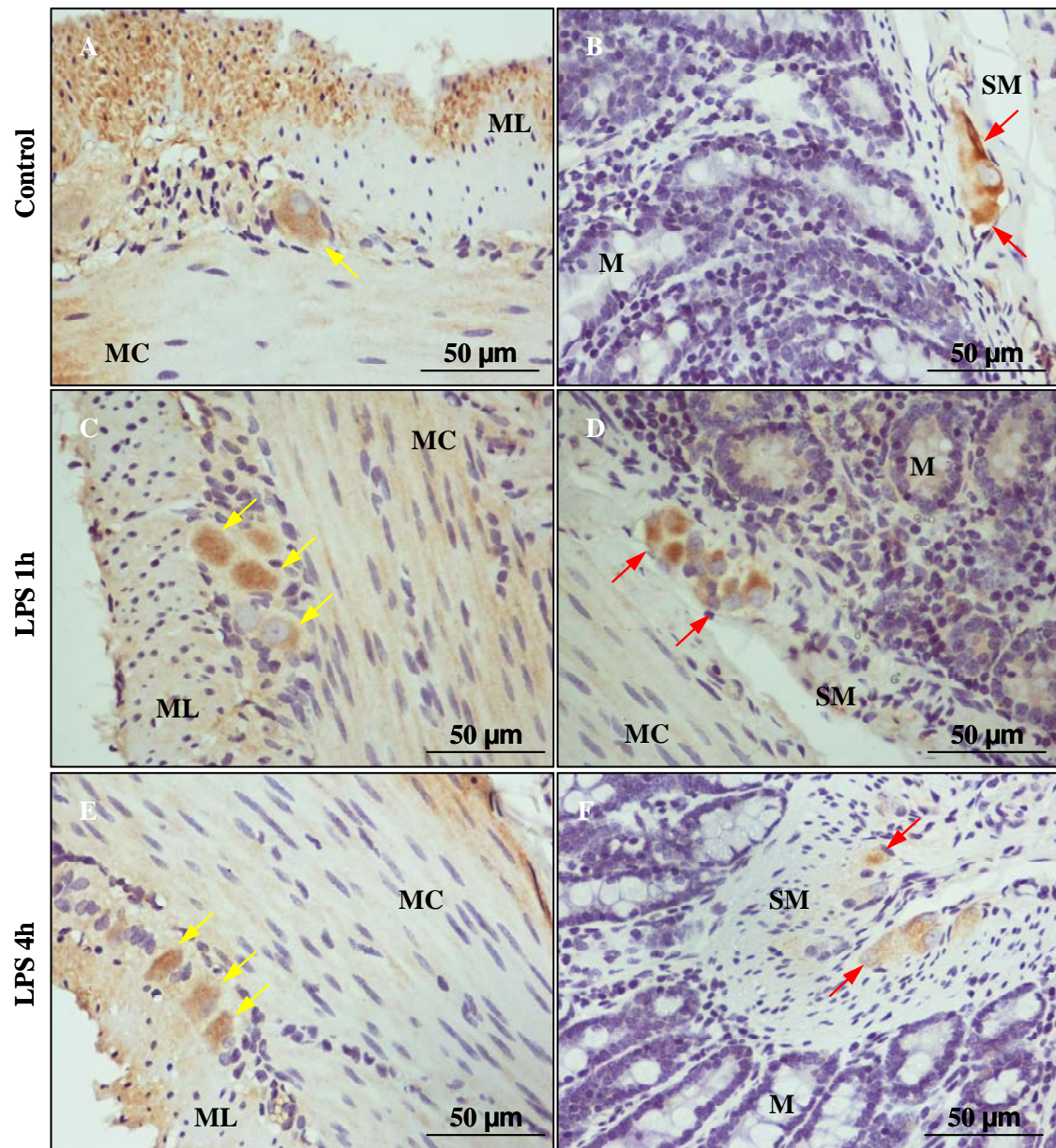


Figura 4.10.11 - Localización del receptor EP<sub>3</sub> en el duodeno de ovejas control (A, B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C, D) ó 4 horas (E, F). El LPS no indujo cambios en la expresión del receptor EP<sub>3</sub> descrita en los tejidos control. Tinción citoplasmática de los miocitos de las capas musculares lisas circular y longitudinal (A, C, D, E), de neuronas mientéricas (flechas amarillas) y submucosas (flechas rojas). M: mucosa. SM: submucosa. MC: muscular circular. ML: muscular longitudinal.



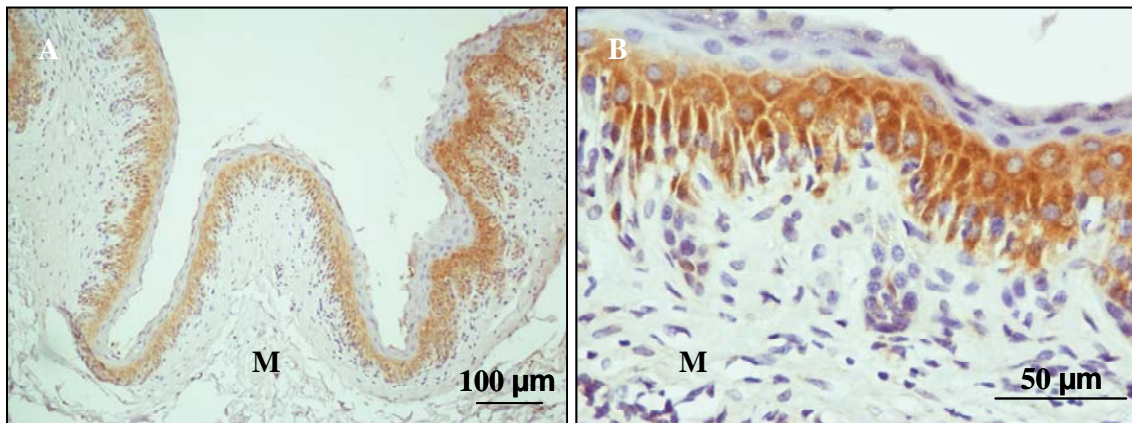
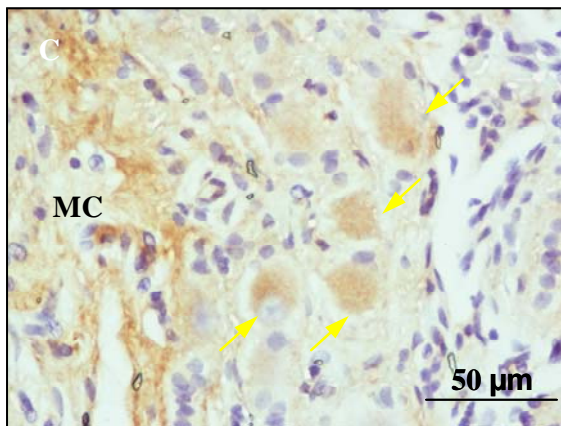
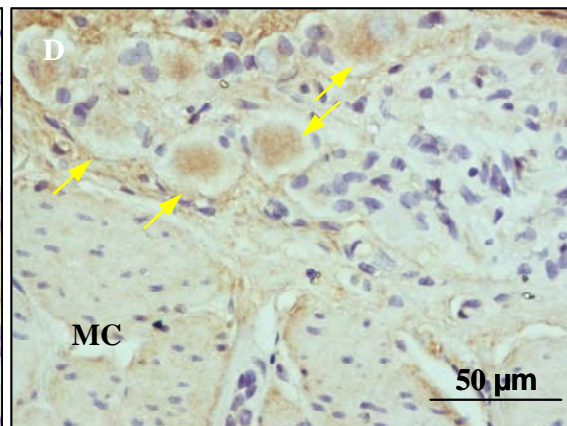
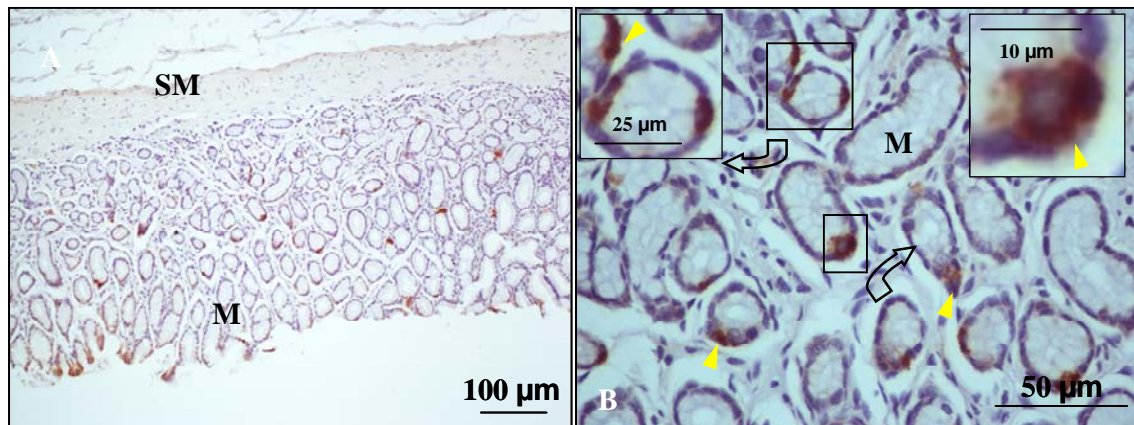
**EP<sub>4</sub> Rumen****Control****LPS 1h****LPS 4h**

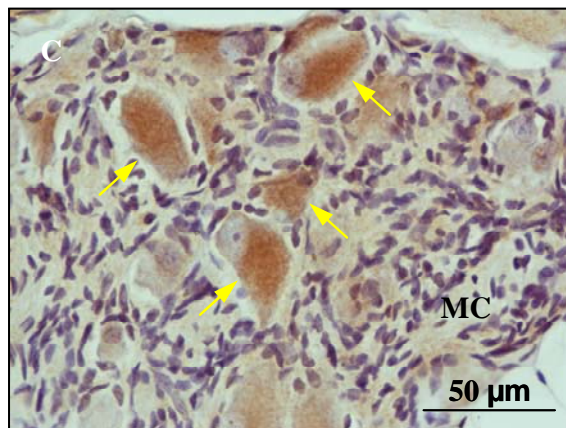
Figura 4.10.12 - Localización del receptor EP<sub>4</sub> en el rumen de las ovejas control (A, B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C) ó 4 horas (D). El LPS no modificó la expresión del receptor. A y B: Tinción en la mucosa, concretamente afectando a los estratos más basales del epitelio. C y D: Tinción citoplasmática de neuronas mientéricas (flechas amarillas). M: mucosa. SM: submucosa. MC: muscular circular.

## EP<sub>4</sub> Antro

### Control



### LPS 1h



### LPS 4h

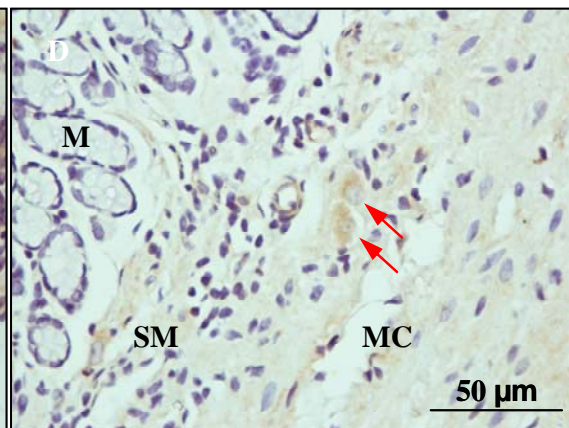


Figura 4.10.13 - Localización del receptor EP<sub>4</sub> en el antro de las ovejas control (A, B) y tratadas con LPS durante 1 hora (C) ó 4 horas (D). El LPS no modificó la expresión del receptor. A y B: Tinción de células redondeadas localizadas en las glándulas de la mucosa (puntas de flechas amarillas). C: Tinción citoplasmática de neuronas mientéricas (flechas amarillas). D: Tinción citoplasmática de neuronas submucosas (flechas rojas). M: mucosa. SM: submucosa. MC: muscular circular.



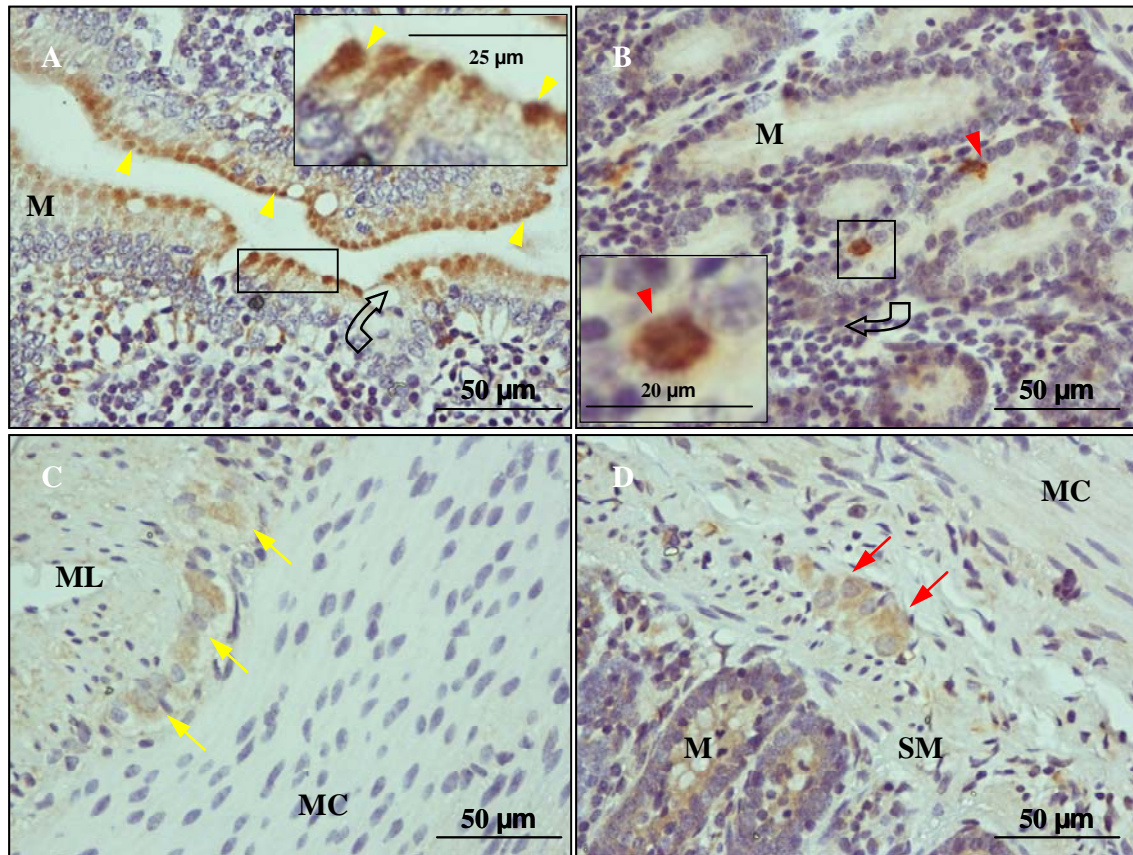
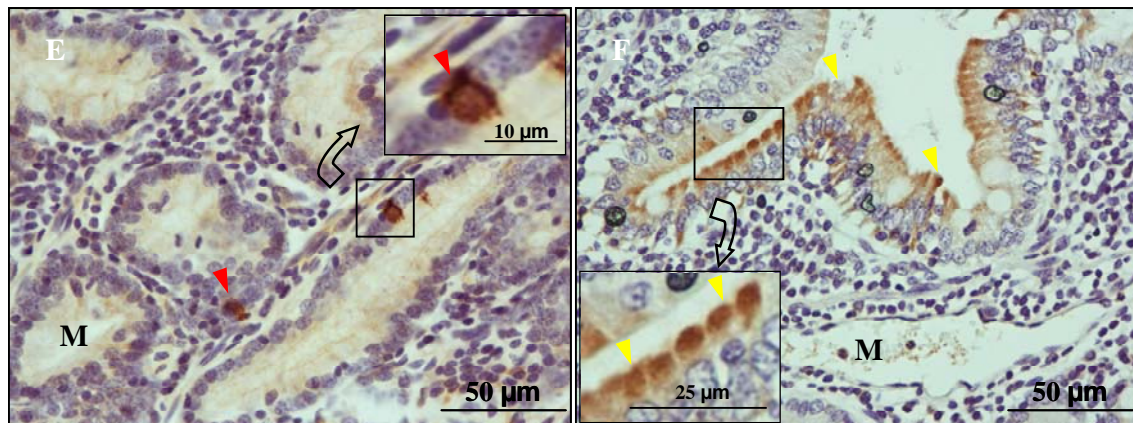
**EP<sub>4</sub> Duodeno****Control****LPS 1h****LPS 4h**

Figura 4.10.14 - Localización del receptor EP<sub>4</sub> en el duodeno de las ovejas control (A-D) y tratadas con LPS durante 1 hora (E) ó 4 horas (F). El LPS no modificó la localización del receptor. A y F: Tinción en la región apical de los enterocitos de las vellosidades intestinales (puntas de flechas amarillas). B y E: Tinción en células redondeadas aisladas en la mucosa (puntas de flechas rojas). C: Tinción citoplasmática de neuronas del plexo mientérico (flechas amarillas). D: Tinción citoplasmática de neuronas del plexo submucoso (flechas rojas). M: mucosa. SM: submucosa. MC: muscular circular.

#### **4.11 EFECTO DEL LPS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs) EN EL HIPOTÁLAMO, BULBO RAQUÍDEO Y EL TRACTO GI DE LA OVEJA**

Al contrario de lo descrito previamente para la expresión de las COX, en el caso de los receptores EPs, tras el tratamiento con LPS no se detectaron cambios de expresión mediante las técnicas de WB e IHC en el hipotálamo, bulbo raquídeo o en el tracto GI de la oveja (Figs. 4.9.3 a 4.10.14 y Tablas 4.9.1 a 4.10.4).

## **5.- DISCUSIÓN**





## 5.1 PAPEL DE LAS CICLOOXIGENASAS (COX) EN LA FIEBRE Y LAS ALTERACIONES MOTORAS GASTROINTESTINALES (GI) INDUCIDAS POR EL LPS

### 5.1.1 EXPRESIÓN DE LAS COX EN EL HIPOTÁLAMO Y BULBO RAQUÍDEO DE LA OVEJA Y SU PAPEL EN LOS EFECTOS INDUCIDOS POR EL LPS

En el presente trabajo hemos detectado inmunorreactividad frente a la **COX-1** en el hipotálamo y bulbo raquídeo de las **ovejas control**. Dicha enzima se localizaba en el endotelio de algunos vasos y en unos gránulos redondeados presentes en torno a núcleos celulares, pudiendo tratarse de glía activada. Así mismo, se localizó en pequeñas células, identificadas como macrófagos perivasculares ED2+, adyacentes a la pared de los vasos o integradas dentro de la pared de los mismos. La expresión de COX-1 en este tipo celular ha sido ya descrita previamente por otros autores en cerebro humano y en médula espinal de rata, identificándolo como microglía o macrófagos (Schwab y cols., 2000, 2000a, 2002, Deininger y cols., 2003).

La microglía constituye el tipo celular inmunitario principal del cerebro que responde ante cambios en la homeostasis cerebral. La microglía reactiva se ha definido como un sensor de eventos patológicos en el SNC (Kreutzberg, 1996) y se le ha asignado un papel neuroprotector esencial para la remodelación del tejido (Streit, 2002). Ello explicaría la presencia de expresión de COX-1 en este tipo celular en los tejidos de animales control, como es nuestro caso. Además, constituye una de las principales fuentes de PGs en el SNC (Matsuo y cols., 1995, Minghetti y Levi, 1998), por lo que dichos mediadores podrían estar implicados en el mantenimiento de la estructura del tejido cerebral en condiciones no patológicas.

En hipotálamo y bulbo raquídeo de **animales control** también hemos observado expresión de **COX-2** en el endotelio de vasos de pared gruesa (arterias o arteriolas), así como en neuronas. Específicamente, localizamos una gran densidad de neuronas expresando COX-2 en el área preóptica del hipotálamo, lo que concuerda con resultados previos en rata (Breder y cols., 1995). En esta especie, el núcleo preóptico medial contiene la mayor densidad de sitios de unión de la PGE<sub>2</sub> (Matsumura y cols., 1990). También hemos observado expresión de COX-2 en neuronas de los núcleos hipotalámicos paraventricular y ventromedial. En la rata, la COX-1 y la COX-2 se distribuyen en neuronas por todo el cerebro, pero es más prevalente en el hipotálamo, donde las PGs podrían estar implicadas en funciones integrativas, como modulación del sistema nervioso autónomo y procesamiento sensorial (Breder y cols., 1995).

No es extraño localizar la COX a nivel endotelial, pues la PGE<sub>2</sub> es un potente dilatador de los vasos sanguíneos cerebrales (Ellis y cols., 1979). Además de la vasodilatación, otras funciones de las PGs en el cerebro son el mantenimiento de la homeostasis, la liberación de neurotransmisores, la regulación de la plasticidad sináptica y, además, pueden producir vasoconstricción (Minghetti, 2004, Minghetti y Levi, 1998, Smith y cols., 2000, Vane y cols., 1998). Además, las PGs sintetizadas por la COX-2 están implicadas en los procesos inflamatorios y de apoptosis (Minghetti, 2004, Simmons y cols., 2004).

En nuestro estudio, la expresión de **COX-1** en hipotálamo y bulbo raquídeo permaneció inalterable tras el tratamiento con **LPS**, lo que concuerda con resultados previos en rata que describen la COX-1 cerebral como insensible ante estímulos proinflamatorios (Ivanov y Romanovsky, 2004). La administración icv de LPS en roedores induce una importante expresión de COX-2 en astroglia y microglía, mientras que la expresión de COX-1 es predominante en la microglía y permanece inalterable (Font-Nieves y cols., 2012).

Un estudio en rata describe la expresión de COX-1 en células perivasculares y microglía parenquimal bajo condiciones basales (García-Bueno y cols., 2009). Sin embargo, en este estudio la administración iv de LPS a dosis de 2 µg/kg produce una marcada inducción de COX-1 en células vasculares (perivasculares y endoteliales). De igual manera, la expresión de COX-1 es mayor en la microglía/macrófagos del SNC en un modelo de daño espinal en ratas (Schwab y cols, 2000), tras la isquemia focal cerebrovascular o el daño traumático cerebral en humanos (Schwab y cols., 2000a, 2002), así como en la corteza cerebral de pacientes fallecidos por la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Deininger y cols., 2003) y en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Yermakova y cols., 1999). En cerdos, la administración iv de LPS aumenta la expresión de la COX-1 en el plexo coroideo (Vellucci y Parrott, 1998).

En nuestro caso hemos observado expresión de COX-1 en microglía parenquimal y en macrófagos perivasculares en animales control. Sin embargo no hemos observado modificación de esta expresión por la administración de LPS. Esto podría ser debido, en primer lugar, a que la dosis de LPS ensayada en nuestro estudio no fuera la suficiente para aumentar la expresión de la COX-1 en la microglía/macrófagos cerebrales de la oveja o que el aumento de expresión sea posterior a las 4 horas del tratamiento, que es el tiempo máximo estudiado por nosotros.

En el presente estudio, el tratamiento con **LPS** durante 1 y 4 horas, inducía la aparición en hipotálamo y bulbo raquídeo de unas células redondeadas inmunopositivas a **COX-2** unas íntimamente relacionadas con los vasos sanguíneos y otras dispersas por el parénquima. Eran especialmente abundantes en la zona del órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) del área preóptica del hipotálamo y en el núcleo preóptico medial a 4h post-tratamiento. Así mismo, el tratamiento con LPS indujo la aparición de microglía reactiva positiva a COX-2 en

el hipotálamo a 1h post-tratamiento y un aumento directamente proporcional al tiempo de tratamiento en la cantidad de neuronas expresando dicha enzima en los núcleos hipotalámicos ventromedial y paraventricular.

Tras la administración iv del LPS, simultáneamente a la respuesta de fiebre, las ovejas mostraban anorexia y polidipsia. Esto podría explicarse por el aumento que observamos en la expresión de COX-2 en las neuronas de los núcleos ventromedial y paraventricular, respectivamente.

El núcleo ventromedial está involucrado en la sensación de saciedad. Las PGs están relacionadas con la menor ingesta de alimento y la pérdida de peso en casos de cáncer (Ruud y cols., 2013). Más concretamente, la PGE<sub>2</sub> de origen central suprime la ingesta de alimento a través de la activación del receptor EP<sub>4</sub> (Ohinata y cols., 2008). En un estudio realizado en ratas, la administración de un inhibidor de la COX-2 previa a la inyección de LPS (100 µg/kg, ip) previene la anorexia (Kopf y cols., 2011).

Por su parte, el núcleo paraventricular sintetiza la hormona antidiurética (ADH), que regula la sed, y oxitocina, que interviene en el parto y comportamiento maternal. Experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que las PGs afectan a la liberación central de ADH. Así, la infusión icv de PGE<sub>2</sub> en rata (Hoffman y Schmid, 1979) y de PGE<sub>1</sub> en cabra (Leksell, 1976) induce liberación de ADH e incrementa la excreción renal de sodio.

A pesar de que la microglía no es una de las principales fuentes productoras de PGs a través de la COX-2, la expresión de la enzima se describe en microglía activada previa a la muerte neuronal (Jiang y cols., 2011), donde la inhibición de la COX-2 puede mitigar de forma significativa la neurotoxicidad inducida por el TNF- $\alpha$ .

Bajo condiciones basales en el SNC se describe que la expresión de COX-2 está localizada exclusivamente en neuronas del SNC (Breder y cols., 1992, 1995). Sin embargo, en consonancia con nuestros resultados, varios trabajos en cerebro de rata describen la expresión de COX-2 tras la administración de LPS en otros tipos celulares como células endoteliales (Matsumura y cols., 1998), macrófagos perivasculares (Schlitz y Sawchenko, 2002, Minghetti y cols., 1999) y en microglía perivascular (Elmqvist y cols., 1997). Concretamente, la administración iv de LPS en feto de oveja a la misma dosis utilizada en nuestros experimentos, induce un aumento de la COX-2 en células perivasculares de la materia gris y blanca a las 24 horas de la inyección. Estas células eran de morfología redondeada, con todo su citoplasma teñido y estaban localizadas próximas a los vasos sanguíneos. Según los autores podría tratarse de pericitos, microglía perivascular o macrófagos que hubiesen penetrado en el tejido procedentes de la sangre (Yan y cols., 2004). Sin embargo, no pudieron afirmarlo con precisión debido a que los anticuerpos frente a marcadores específicos de cada uno de estos tipos celulares no funcionaron en el cerebro fetal

ovino. Otro hallazgo interesante de dicho estudio es la presencia de albúmina en muchas zonas del cerebro de estos animales tratados con LPS. El hecho de que se encuentren proteínas plasmáticas fuera de los vasos indica que el LPS podría alterar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo el paso de sustancias e incluso células inmunitarias desde la sangre al parénquima del SNC, iniciándose en él un proceso inflamatorio.

Hacia los años 90 se plantearon dos teorías principales relativas al origen celular de las PGs en el cerebro (Saper, 2010). La primera de ellas sugiere que las células productoras de COX y PGE<sub>2</sub> en respuesta a la estimulación inmune por la administración de LPS o IL-1 son células endoteliales de los vasos cerebrales de la zona de la barrera hematoencefálica, (Matsumura y cols., 1998). La otra teoría sugiere que son células perivasculares las que responden a estos estímulos inmunes (Elmqvist y cols., 1997, Schiltz y Sawchenko, 2002). Así, la administración iv de dosis bajas de IL-1 o LPS inducen la expresión de COX-2 inicialmente en células perivasculares y dosis más altas activan también la expresión en células endoteliales (Schiltz y Sawchenko, 2002).

Basándonos en la morfología y localización de las células positivas a COX-2 encontradas en nuestro trabajo tras la administración iv de LPS y según lo recogido en la bibliografía expuesta anteriormente, podría tratarse de pericitos, células endoteliales, macrófagos perivasculares o macrófagos procedentes de la sangre e infiltrados en el tejido, células todas con capacidad fagocitaria y de defensa del organismo. Utilizando técnicas de inmunohistoquímica doble con el marcador específico de los macrófagos perivasculares (CD163/ED2) hemos observado que son estas células en las que aumenta la expresión de la COX-2 y por tanto serían las principales productoras de PGs a nivel cerebral en respuesta al tratamiento con LPS en la oveja.

El anticuerpo policlonal CD163/ED2 se define como el marcador clásico de células perivasculares (Angelov y cols., 1998). Diversos experimentos muestran que la presentación de antígenos en el SNC es realizada por una población especializada de células denominada “células perivasculares”, localizadas en íntima relación con la lámina basal de la vasculatura cerebral (Graeber y cols., 1989). A diferencia de los pericitos, las células perivasculares expresan el antígeno de membrana de macrófagos CD163/ED2 (Dijkstra y Damoiseaux, 1993). Este marcador reconoce una proteína de superficie en macrófagos residentes consistente en tres cadenas peptídicas de 175, 160 y 95 kDa. Recientemente se ha identificado el antígeno ED2 como la glicoproteína CD163 en la rata (Polfliet y cols., 2006). La glicoproteína CD163 de la rata está constitutivamente expresada en la mayoría de las poblaciones de macrófagos tisulares maduros, células de Kupffer hepáticas, macrófagos residentes de la médula ósea y macrófagos perivasculares y meningeales del SNC. En el cerebro normal, el receptor CD163 está restringido a macrófagos perivasculares (Fabriek y cols., 2005), y en menor medida en la microglía parenquimal, y su aumento en dichas células

se describe en varios desórdenes del SNC, como la encefalitis vírica y la esclerosis múltiple (Fabriek y cols., 2005; Kim y cols., 2006). La acumulación de macrófagos/microglia CD163+ parenquimal también se detecta en el caso de infección por virus de la inmunodeficiencia humana y simia (Roberts y cols., 2004; Borda y cols., 2008). En un modelo de infarto de miocardio en ratas, se induce la expresión de la COX-2 en macrófagos perivasculares de la barrera hematoencefálica (Yu y cols., 2010).

El área preóptica contiene neuronas que son sensibles a cambios pequeños en la temperatura corporal. La hipótesis más admitida sobre la génesis de la fiebre es que está modulada en el área preóptica ventromedial del hipotálamo donde, en respuesta a citocinas pirogénicas producidas en la periferia por fagocitos mononucleares, tiene lugar la producción de PGE<sub>2</sub> dependiente de la COX-2 (Blatteis, 2006). Las citocinas sanguíneas alcanzarían el área preóptica a través de órganos circumventriculares, carentes de barrera hematoencefálica, en particular el OVLT, situado en la zona media del área preóptica. Luego, los prostanoídes sintetizados en esta área inducirían los componentes de la respuesta de fase aguda, incluyendo la génesis de la fiebre y el aumento de glucocorticoides en plasma (Breder y cols., 1992). El corto periodo de latencia en el comienzo de la fiebre *in vivo* sugiere que la producción inicial de PGs depende de células que deben expresar de forma constitutiva la COX (Raz y cols., 1988). Esto es consistente con el hecho de que en nuestro trabajo hayamos detectado la aparición tras la inoculación de LPS de una importante cantidad de macrófagos ED2+ en la zona del OVLT y del núcleo preóptico medial. Así, estas células podrían representar la principal fuente de PGs durante las respuestas inflamatorias en el cerebro o al menos en sus estadios iniciales.

Tal y como se ha descrito en el apartado de introducción, en el bulbo raquídeo de rumiantes se han descrito los denominados centros gástricos. Su papel es el de permitir un movimiento cíclico del rumen mediante reflejos vagales y coordinar esta actividad cíclica con el proceso de la regurgitación y eructación. Así, el aumento en la expresión de COX-2 tras el LPS en macrófagos ED2+ en la zona del bulbo raquídeo induciría la síntesis de PGs que serían las responsables finales de las alteraciones sobre la motilidad GI.

### **5.1.2 EXPRESIÓN DE LAS COX EN TEJIDOS PERIFÉRICOS (HÍGADO Y PULMÓN) DE LA OVEJA Y SU PAPEL EN LOS EFECTOS INDUCIDOS POR EL LPS**

Estudios previos de nuestro grupo determinaron que la administración iv de PGE<sub>2</sub>, a dosis que no modificaban la temperatura corporal, disminuía la motilidad GI, de forma similar a los efectos observados tras la administración iv de LPS, sugiriendo un posible papel de las PGs periféricas en las alteraciones motoras digestivas inducidas por la endotoxina (Guerrero-Lindner, 2002). Estudios de western blot e inmunohistoquímica mostraron que el

LPS en la oveja no aumenta la expresión de COX-1 o COX-2 en el tracto GI (Castro, 2010). Ya que la administración de LPS se realizaba por vía periférica (vena yugular), estas PGs podrían provenir de células localizadas en otros órganos periféricos. Teniendo en cuenta que los macrófagos pulmonares y hepáticos reconocen el LPS, este tipo celular podría ser el productor de PGs. Estas PGs a su vez, transmitirían la señal hasta el cerebro.

Nuestros resultados mostraron que los efectos del LPS sobre la  $t^a$  y la motilidad GI eran bloqueados por el pretratamiento iv con tiloxapol (200 mg/kg/h, 1h), agente que desensibiliza los receptores de los macrófagos. El tiloxapol o Triton WR-1339, es un detergente formado por una mezcla de polímeros lineales de Triton X-100 y del que previamente ya se había demostrado su eficacia en la prevención del shock endotóxico en conejo, rata (Serikov y cols., 2003), caballos (Longworth y cols., 1996) y ovejas (Staub y cols., 2001). Serikov y cols. describen en 2003 que el tiloxapol *in vitro* bloquea la unión de la endotoxina a macrófagos murinos y células en cultivo que expresan CD14, así como la activación de macrófagos y algunas reacciones antígeno-anticuerpo. Por ello, nuestros resultados concuerdan con la existencia de una participación de macrófagos periféricos en los efectos producidos por el LPS.

En nuestro trabajo, la administración de otro inhibidor de macrófagos, el clorhexahidrato de gadolinio (10 mg/kg, iv) no bloqueaba los efectos del LPS. Sorprendentemente, inducía un aumento bifásico de la temperatura corporal, un aumento en la frecuencia del MMC y una inhibición de la actividad mioeléctrica integrada, efectos todos ellos similares a los producidos por la administración iv de LPS en oveja. Estudios previos describen que el gadolinio produce una inactivación de macrófagos, reduciendo la capacidad de captación de partículas del torrente sanguíneo (Molina y cols., 1995) y suprimiendo las respuestas inmunitarias e inflamatorias (Limuro y cols., 1994). Más concretamente, otro estudio demuestra que el mecanismo de acción de este agente induce la apoptosis en cultivos de macrófagos alveolares de rata (Mizgerd y cols., 1996), de manera tiempo y dosis-dependiente, lo cual podría explicar el resultado observado en nuestro estudio. La asociación del gadolinio con los macrófagos tiene lugar en pocos minutos, produciéndose una unión estable y su internalización en endosomas. Mizgerd y cols., describen que los cambios morfológicos y bioquímicos típicos de la apoptosis se observan a las 8 horas tras la exposición al gadolinio y la pérdida de integridad de la membrana se evidencia tras un tiempo de exposición mayor, de 16 a 24 horas. Concretamente, el gadolinio intranuclear sería el responsable de la apoptosis, activando endonucleasas dependientes de  $Ca^{2+}$  o directamente induciendo daño del DNA (Mizgerd y cols., 1996). Así, la inducción de la apoptosis contribuiría a la disfunción de los macrófagos inducida por el gadolinio *in vivo*, siendo los macrófagos asociados a vasos sanguíneos, como son las células de Kupffer o los macrófagos pulmonares intravasculares, los más afectados por la administración iv de este producto. La lisis de los macrófagos provocaría la liberación al torrente sanguíneo de citocinas y otros

mediadores que serían los responsables de la fiebre y las alteraciones motoras GI inducidas por el gadolinio en nuestro modelo.

En el presente estudio se detectó la expresión **hepática** de **COX-1** en endotelios vasculares, células de morfología endocrina en el epitelio de conductos biliares y en algunas células de Kupffer en espacios porta y sinusoides hepáticos. El tratamiento con LPS no modificó dicha expresión. Estos resultados coinciden con lo ya descrito por otros autores que localizan la COX-1 principalmente en células de Kupffer y células endoteliales (Mohammed y cols., 2004; Graupera y cols., 2005). Estos estudios tampoco observan diferencias significativas en la expresión de dicha enzima entre el hígado sano y cirrótico de pacientes humanos y de rata.

En nuestro estudio, la **COX-2** se expresó en endotelios vasculares y en algunas células de Kupffer de las ovejas control. En el caso de las dos COX, los hepatocitos aparecieron exentos de tinción, lo que podría deberse al hecho de que en las células endoteliales y las células de Kupffer la actividad de la ciclooxygenasa sea mayor que en los hepatocitos (Mion y cols., 1995). Previamente, Johnston y Kroening (1996) ya demostraron mediante cultivos de hepatocitos aislados de rata que, incluso ante estímulos apropiados como es la peroxidación lipídica inducida por la incubación con CCl<sub>4</sub>, no expresan COX-2 a diferencia de otras células intrahepáticas como las células de Kupffer y las células estrelladas. Sin embargo, en cultivos primarios de hepatocitos fetales el tratamiento con LPS inducía la expresión de COX-2 (Martín-Sanz y cols., 1998).

En el hígado, las PGs se han involucrado, fundamentalmente, en procesos de regeneración hepática mediante la estimulación de la proliferación de los hepatocitos (Tsuji y cols., 1993), en la remodelación tisular y fibrogénesis (Callejas y cols., 2001) y en la hipertensión portal (Graupera y cols., 2003). Todos estos estudios ponen de manifiesto que esta producción de PGs depende fundamentalmente del aumento de la expresión de la COX-2.

Hemos detectado la expresión de COX-1 en células con morfología de lágrima en el epitelio de los conductos biliares, que podrían corresponder con células endocrinas. No hemos encontrado en la bibliografía datos sobre la expresión de COX-1 en células endocrinas en el hígado de otras especies. Así, en la oveja, la expresión basal de la COX-1 en estas células guardaría relación con la estimulación que las prostaglandinas ejercen sobre la secreción biliar en animales control.

La presencia de COX-1 y COX-2 en endotelios vasculares es consistente con el hecho de que los productos derivados de las COX intervienen en el proceso inflamatorio produciendo vasodilatación, aumento del flujo sanguíneo local y de la permeabilidad vascular (Núñez y cols., 2003). Otros estudios ponen de manifiesto que la producción de tromboxano

2, derivado de la COX-2, tiene un papel fundamental en el aumento de la resistencia vascular a nivel sinusoidal (Graupera y cols., 2003).

La COX-1 hepática produce prostanoïdes con acción extracelular para o autocrina que actúan en la regulación de la homeostasis del medio, mientras que la COX-2 tendría dos funciones; la primera, en relación con su localización en el retículo endoplásmico, sería la de colaborar en el aumento de la función de la COX-1, y la segunda, propia de la COX-2 localizada en la superficie interna de la membrana nuclear, sería la de actuar como un sistema de producción de PG con acción nuclear en la replicación y diferenciación celular (Smith y cols., 1996).

En nuestro modelo, el tratamiento con LPS provocaba un aumento en la expresión de COX-2, concretamente en macrófagos hepáticos o células de Kupffer (ED2+). El western blotting mostró que dicho aumento era mayor conforme aumentaba el tiempo de tratamiento. La endotoxemia aguda se asocia con la infiltración de macrófagos en el hígado. Se ha demostrado que estas células se activan para liberar mediadores que contribuyen a los efectos inflamatorios, particularmente los eicosanoides. Estos mediadores pueden modular la permeabilidad vascular, el flujo sanguíneo, la agregación plaquetaria o la producción de mediadores citotóxicos (Ahmad y cols., 2002). Así en un modelo de endotoxemia aguda en rata (5 mg/kg iv de LPS), también se describe un aumento rápido y transitorio de la expresión de COX-2 y PGE<sub>2</sub> en macrófagos hepáticos (Ahmad y cols., 2002).

Previamente también en rata, se ha descrito que las fases finales de la fiebre están mediadas por la PGE<sub>2</sub> originada en células endoteliales y perivasculares del cerebro. Sin embargo, la primera fase de la fiebre inducida por LPS está asociada a un aumento de COX-2 en hígado y pulmón, pero no en el cerebro, indicando que en esta especie esta primera fase está asociada a una activación de señales inflamatorias y un aumento de la síntesis de PGE<sub>2</sub> en la periferia (Steiner y cols., 2006). En este trabajo, a nivel pulmonar las células positivas a COX-2 se agrupan alrededor de alvéolos y, en el hígado, la mayoría de las células positivas a COX-2 se localizan en el estroma, en proximidad a los sinusoides. Algunas de estas células también se hallaban alrededor de la vena central y en el peritoneo visceral que recubre al hígado. En ambos órganos, la mayoría de estas células positivas a COX-2 eran macrófagos. Por tanto, nuestros resultados van en consonancia con resultados descritos anteriormente, en los que la producción de PGs en el hígado se asocia con la expresión de la COX-2 en células no hepatocíticas, principalmente células de Kupffer y macrófagos infiltrados.

Sin embargo, en un estudio sobre la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial en rata, se describe que el aumento de PGs tras la resección tisular se asocia al aumento en la expresión de COX-2, pero no solo en células de Kupffer sino también en hepatocitos (Casado y cols., 2001).



Aumentos en la expresión de la COX-2 también se han descrito previamente en el tejido hepático de pacientes con hepatitis C crónica (Manning y cols., 2007), en el hepatocarcinoma (Cervello y Montalto, 2006, Giannitrapani y cols., 2009), en modelos de hipertensión portal en rata inducida por la ligadura del conducto biliar (Yokoyama y cols., 2003) y en hígados cirróticos en rata (Graupera y cols., 2005). En estos últimos, la COX-2 se localiza en células inflamatorias que infiltran el órgano (principalmente células mononucleares), células de Kupffer en espacios sinusoidales, células endoteliales y en células del epitelio de conductos biliares (Mohammed y cols., 2004; Jeong y cols., 2010).

Dado que el hígado contiene la mayor población de fagocitos mononucleares (células de Kupffer), es el sitio primario de eliminación del LPS circulante y, por tanto, la principal fuente de citocinas inducidas por la endotoxina. La señal pirogénica podría, por tanto, originarse aquí.

De hecho, se ha demostrado el papel fundamental de las células de Kupffer en la génesis de la fiebre (Li y Blatteis, 2004; Li y cols., 2004). Li y Blatteis demuestran que el desencadenamiento de la respuesta febril ante la administración de LPS está relacionado con la aparición de la endotoxina en las células de Kupffer hepáticas. El reconocimiento de la endotoxina por las células de Kupffer podría provocar la activación de la cascada del complemento, con la consiguiente producción de la anafilotoxina C5a, lo que es un estímulo directo de la producción de PGE<sub>2</sub>, como se ha observado en otros modelos experimentales (Blatteis, 2007).

Las células de Kupffer activadas por el LPS producirían PGE<sub>2</sub>, cuyos niveles aumentarían rápidamente en sangre venosa y, en menor medida, en sangre arterial tras la administración del pirógeno (Li y cols., 2006; Perlik y cols., 2005; Rotondo y cols., 1988). De hecho, en la oveja se ha observado un aumento de las tasas plasmáticas de PGE<sub>2</sub> tras la administración de LPS iv (Skarnes y cols., 1981). Así, la PGE<sub>2</sub> actuaría sobre sus receptores periféricos y también sería transportada hasta el cerebro formando un complejo junto con la albúmina (Ivanov y Romanovsky, 2004). El principal receptor de la anafilotoxina C5a es el C5aR<sub>1</sub>, receptor ligado a una proteína G que actúa incrementando los niveles intracelulares de inositol-1,4,5-trifosfato y calcio y aumentando la producción de PGE<sub>2</sub> catalizada por la COX-1. La COX-1 es constitutiva y, funcionalmente, está principalmente acoplada con la sintasa citosólica de la PGE<sub>2</sub> (PGES) y, por tanto, preparada para sintetizar rápidamente PGE<sub>2</sub>. Por otro lado, está generalmente aceptado que la producción de PGE<sub>2</sub> inducida por el LPS *per se* es iniciada por la transferencia del mismo por medio de la proteína sérica LBP al complejo CD14/TLR4/MD2 y está asociada específicamente al aumento de COX-2 y de la sintasa microsomal PGES-1.

En ratas (Derijk y cols., 1993) y cobayas (Sehic y cols., 1998), la depleción de macrófagos en órganos periféricos mediante drogas citotóxicas atenúa la primera fase de la

fiebre inducida por el LPS. Concretamente, la depleción de las células de Kupffer atenúa la primera fase de la fiebre tras la administración de LPS iv, invierte la segunda fase hacia una bajada de la temperatura y reduce en gran medida el aumento de PGE<sub>2</sub> asociado a la fiebre en el área preóptica hipotalámica (Sehic y cols., 1998).

En el **pulmón**, las vías de la COX-1 y COX-2 forman parte de los diferentes mediadores implicados en procesos fisiológicos y fisiopatológicos, tales como la regulación del tono vascular, fibrosis pulmonar y remodelación de tejidos, homeostasis del surfactante, macrófagos alveolares y su papel en la defensa pulmonar, secreción de moco bronquial y patogenia del asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Radi y cols., 2010).

En el pulmón de las ovejas control de nuestro trabajo, las dos COX se localizaron en células del endotelio vascular y en células de morfología endocrina intercaladas en el epitelio de bronquios y bronquiolos. Además, en el caso de la COX-2, también se localizó en algunos macrófagos pulmonares (VPM32+) aislados y distribuidos por el parénquima.

En nuestro modelo, tras la administración iv del LPS, aparecían agregados celulares relacionados con vasos sanguíneos expresando las dos COX, y que se correspondían con macrófagos pulmonares (VPM32+). El anticuerpo monoclonal VPM32 es un marcador específico de macrófagos pulmonares ovinos (Mwangi y cols., 2007; Carrasco y cols., 2004; Ferreras-Estrada y cols., 2007), siendo uno de los más útiles, ya que el antígeno reconocido (CD11) está presente en gran cantidad en el citoplasma de todos los macrófagos alveolares (Luján y cols., 1994). Se ha descrito que el número de macrófagos pulmonares intravasculares (PIMs), población de células residentes en pulmón, es superior al de macrófagos alveolares (MA) en la mayoría de las ovejas (Carrasco y cols., 2004), y que éstos aparecen adheridos al endotelio de capilares.

Los prostanoideos sintetizados por la COX-1 se relacionan con una regulación del tono bronquial, transporte de iones, secreción mucosa y neurotransmisión simpática. En el pulmón de rata, la COX-1 está localizada en el epitelio y músculo liso bronquiolar, macrófagos alveolares, células endoteliales y células musculares lisas vasculares. (Ermert y cols., 1998; 2000). En esta especie, la localización celular y la expresión de la COX-1 permanecen inalterables en respuesta al LPS, lo que concuerda con lo ya también descrito en conejo (DeLong y cols., 1999). Estas observaciones apoyan la idea de que la COX-1 es una enzima constitutiva, que no responde rápidamente ante condiciones inflamatorias y que está ligada principalmente a funciones fisiológicas. Sin embargo, en nuestro trabajo, el tratamiento con la endotoxina inducía la expresión de COX-1 en agregados de macrófagos pulmonares relacionados con vasos sanguíneos.

Estudios previos en el pulmón de la oveja, localizan la COX-1 en células endoteliales y en el epitelio respiratorio, teniendo una implicación fundamental en la vasodilatación,

broncodilatación y síntesis de surfactante (Brannon y cols., 1998). En el caso del pulmón de corderos recién nacidos, se describe la expresión de COX-1 tanto en animales control como en aquellos infectados por virus de tropismo respiratorio, aumentando de forma intensa la expresión de COX-1 en macrófagos (Radi y cols., 2010). La COX-1 es en gran parte responsable de la actividad enzimática observada en los macrófagos alveolares (Wilborn y cols., 1995). Todos estos datos van acordes con nuestros resultados en oveja.

De igual manera, nuestros resultados muestran un marcado aumento en la expresión de la COX-2 en macrófagos pulmonares tras el tratamiento con LPS. Esto concuerda con el hecho de que la mayoría de las células que expresan dicha enzima durante la primera fase de la fiebre son células de origen hematopoyético, especialmente macrófagos, constituyendo la principal fuente de PGE<sub>2</sub> (Hempel y cols., 1994). Por ello, los macrófagos se han postulado como el tipo celular primario en expresar COX-2 y producir PGs en los sitios de inflamación (Seibert y cols., 1994).

Numerosos estudios muestran aumentos en la expresión de la COX-2 pulmonar asociado a procesos infecciosos e inflamatorios. Así, en corderos neonatos se describe una mínima expresión de COX-2 en células epiteliales de bronquios y bronquiolos de animales control, mientras que aumenta, al igual que la COX-1, en aquellos infectados por virus de tropismo respiratorio (Radi y cols., 2010). Lo mismo sucede en ratas infectadas experimentalmente con el virus respiratorio sincitial (Richardson y cols., 2005) o en un modelo de sepsis en rata, en el que el LPS induce la expresión de COX-2 en células endoteliales, así como en la mayoría de los macrófagos alveolares (Ermert y cols., 2000). Otros estudios demuestran bajos niveles de COX-2 en cultivos de células no tratadas del epitelio respiratorio humano (Mitchell y cols., 1994), mientras que en modelos de daño epitelial inducido por ácido se describen aumentos en la síntesis de PGE<sub>2</sub> y una regulación positiva de la expresión y actividad de la COX-2 (Bonnans y cols., 2006). El marcado aumento en la expresión de COX-2 en el epitelio de las vías aéreas es consistente con su conocido papel como primera línea de defensa ante la entrada de patógenos por vía respiratoria.

Aumentos en la expresión de COX-2 en macrófagos alveolares también se describen en el modelo de síndrome agudo de diestrés respiratorio en ratón (Adawi y cols., 1998), en la infección por Rhinovirus en el hombre (Seymour y cols., 2002) o en la infección por virus de tropismo respiratorio en corderos neonatos (Radi y cols., 2010). Los macrófagos pulmonares intravasculares (PIMs) son una población de células fagocíticas residentes del pulmón, adheridos al endotelio de capilares y morfológicamente similares a las células de Kupffer hepáticas (Winkler, 1988), siendo especialmente abundantes en la oveja y que parecen ser las primeras células que reconocen a las sustancias inyectadas por la vena yugular en la oveja y otros ungulados (Warner, 1996). En oveja, se ha descrito que la estimulación de los PIMs

aumenta la permeabilidad microvascular a través de la liberación de metabolitos del ácido araquidónico (Suzuki y cols., 1993).

Las células de clara o bronquiolares son células aciliadas secretoras de sustancias tensoactivas que constituyen una importante población celular del epitelio respiratorio durante la lesión pulmonar. Se ha descrito que la expresión de COX-2 en las vías aéreas pequeñas se localiza en células epiteliales no ciliadas, además de otros tipos celulares (Britt y cols., 2012). Estos autores sugieren que la expresión de COX-2 en estas vías pueda tener un papel homeostático, mientras que el aumento de la misma y la consiguiente producción de PGs durante la inflamación, es probablemente transitoria y regulada, especulando que son las células de clara las que muestran este aumento durante las respuestas iniciales a la infección por *E. coli*.

Durante el inicio de la inflamación en el pulmón, la PGE<sub>2</sub> regula la constricción vascular y de vías respiratorias aumentando la permeabilidad (Park y Christman., 2006). Posteriormente inicia las vías implicadas en la activación de células inflamatorias. Estudios utilizando ratones deficientes para la COX-2 demuestran un papel esencial de la expresión de PGE<sub>2</sub> en la prevención de la fibrosis pulmonar (Hodges y cols., 2004; Bonner y cols., 2002) y broncoconstricción en respuesta al LPS (Zeldin y cols., 2001).

Por tanto, en nuestro trabajo hemos observado que, transcurrida 1 hora de la administración iv de LPS y coincidiendo con el primer pico febril, se detectaban aumentos en la expresión de COX-2 tanto a nivel central como en tejidos periféricos y de COX-1 a nivel pulmonar. Sin embargo, el LPS podría estimular de forma inicial la expresión de la COX-2 en los macrófagos periféricos de hígado y pulmón puesto que en un estudio previo llevado a cabo en oveja utilizando la misma dosis de LPS que en nuestro modelo, el aumento plasmático de PGE<sub>2</sub> se detectaba ya a los 30 min de la infusión de la endotoxina, manteniéndose elevados los niveles durante dos horas (Skarnes y cols., 1981). Posteriormente, las PGs sintetizadas a partir de estos macrófagos alcanzarían el SNC a través del OVLT o por medio de aferencias vagales, llegando al área preóptica y desencadenando la respuesta febril. Las PGs sintetizadas en la zona del bulbo raquídeo actuarían sobre los núcleos responsables del control de la motilidad digestiva, resultando en una alteración de ésta.

## **5.2 PAPEL DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1, 2, 3 y 4</sub>) EN LA FIEBRE Y LAS ALTERACIONES MOTORAS GASTROINTESTINALES (GI) INDUCIDAS POR EL LPS**

Entre las PGs liberadas por el LPS, la PGE<sub>2</sub> se ha mostrado como una de las principales implicadas en sus efectos. Resultados previos de nuestro grupo ya demostraron que la

administración icv de PGE<sub>2</sub> en el SNC de la oveja reproduce los efectos del LPS induciendo fiebre y alterando la motilidad digestiva (Guerrero-Lindner, 2002). Además, la inyección iv de PGE<sub>2</sub> disminuye la motilidad GI, sugiriendo una participación a nivel periférico. Por todo ello, nos propusimos llevar a cabo un estudio de la localización de los receptores de la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1, 2, 3 y 4</sub>) a nivel del SNC y tracto GI de la oveja, así como su participación en los efectos producidos por el LPS.

### **5.2.1 EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs) EN EL HIPOTÁLAMO Y BULBO RAQUÍDEO DE LA OVEJA**

En el presente estudio hemos demostrado que en la oveja se expresan los cuatro subtipos de receptores EP en neuronas del hipotálamo y bulbo raquídeo.

Estudios previos en la rata han descrito que, de los cuatro receptores EP de la PGE<sub>2</sub>, los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> están localizados en el área preóptica del hipotálamo (Oka y cols., 2000). Por medio de estudios de hibridación in situ se ha descrito que el mRNA del receptor EP<sub>3</sub> está ampliamente distribuido en el SNC (Sugimoto y cols., 1994), siendo particularmente abundante en las neuronas de las regiones que rodean al órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT), área carente de barrera hematoencefálica y principal órgano circumventricular implicado en la termorregulación. En la rata, la expresión de la COX-2 es inducida en esta región en respuesta a la administración periférica de LPS (Cao y cols., 1995), por lo que las PGs producidas por esta COX-2 podrían actuar sobre el receptor EP<sub>3</sub> en este área para desencadenar la fiebre. De hecho, las neuronas de la región preóptica que expresan este receptor se proyectan directamente al hipotálamo dorsomedial y al núcleo pálido del rafe, sitios clave para el control de los efectos termorregulatorios (Nakamura y cols., 2009), activando la termogénesis en el tejido adiposo marrón y aumentando la vasoconstricción cutánea. Nuestros resultados en la oveja concuerdan con esta hipótesis ya que hemos detectado un aumento en la expresión de la COX-2 en la zona preóptica del hipotálamo tras el tratamiento iv con LPS, lo que conduciría al aumento en la síntesis de PGE<sub>2</sub> en esta zona. Además, hemos detectado, mediante WB e IHC, la expresión de todos los receptores de la PGE<sub>2</sub> en las neuronas del hipotálamo. Por ello, esta PGE<sub>2</sub> liberada por la COX-2 tras su inducción por el LPS en la oveja podría activar los receptores EP<sub>3</sub> para inducir la fiebre.

Basándonos en la distribución del receptor EP<sub>3</sub> en el SNC, sería posible que la PGE<sub>2</sub> mediase las señales evocadas por las citocinas sanguíneas en áreas que carecen de barrera hematoencefálica, como es el caso del OVLT, pero también la PGE<sub>2</sub> podría actuar tras ser sintetizada en otras zonas del cerebro para modular varias actividades neuronales.

En ratón se ha observado que el mRNA del receptor EP<sub>3</sub> está expresado en neuronas de la corteza, hipocampo, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo y tronco del encéfalo. También se ha

localizado en neuronas monoaminérgicas del tronco encefálico, como en el locus cerúleo (adrenérgico), el núcleo del rafe (serotoninérgico) y la sustancia negra (dopaminérgica). Por su parte, el mRNA del receptor EP<sub>4</sub> sólo se detectó en neuronas del hipotálamo y tallo cerebral inferior y el mRNA del receptor EP<sub>1</sub> en neuronas del tálamo (Narumiya y cols., 1999). Estos autores sugieren que se deben establecer las funciones de estos receptores en el SNC.

### 5.2.2 EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs) EN EL TRACTO GI DE LA OVEJA

Los resultados que se han obtenido en el presente trabajo mediante WB e IHC han mostrado la presencia de los cuatro receptores de la PGE<sub>2</sub> en todos los tramos estudiados del tracto GI de la oveja.

Hemos detectado la expresión citoplasmática de los cuatro subtipos de receptores EP en **neuronas** de los plexos del sistema nervioso entérico, tanto mientérico como submucoso. Estudios previos en rata y ratón describen la presencia del mRNA de los subtipos EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> en las neuronas mientéricas del tracto GI (Northey y cols. 2000, Morimoto y cols., 1997), así como la proteína de los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> en neuronas entéricas del tracto intestinal de conejo (Grasa y cols., 2006), o el receptor EP<sub>2</sub> en neuronas entéricas del ileon de cobayas (Lawrence y cols., 1992). Hay evidencias que sugieren la presencia en el intestino de receptores EP presinápticos, cuya activación también alteraría la motilidad indirectamente por medio de la despolarización y liberación de neurotransmisores de neuronas mientéricas involucradas en el control de la actividad contráctil del músculo liso (Dekkers y cols., 1997; Manning y cols., 2002). Así, se sugiere que la PGE<sub>2</sub> estimularía la motilidad intestinal a través de acciones neuro-modulatorias (Mulholland y Simeone, 1993; Bennett y cols., 1975). Concretamente, en cultivos primarios de neuronas mientéricas de cobaya, la PGE<sub>2</sub> induce la liberación de acetilcolina, por lo que se ha propuesto que las contracciones inducidas por la PGE<sub>2</sub> estarían parcialmente mediadas por la activación de neuronas motoras colinérgicas del plexo mientérico (Mulholland y Simeone, 1993).

En nuestro estudio también se ha detectado la expresión del receptor EP<sub>3</sub> en las células **musculares** lisas de las capas circular y longitudinal de todo el tracto GI, coincidiendo con lo ya descrito en el intestino delgado de la rata (Ding y cols., 1997) y el conejo (Grasa y cols., 2006). Así, es posible que las contracciones del músculo liso GI inducidas por la PGE<sub>2</sub>, estuviesen mediadas por un efecto directo sobre receptores EP<sub>3</sub> activando el músculo liso GI y un efecto indirecto estimulando neuronas mientéricas a través de receptores EP<sub>1</sub> (Narumiya y cols., 1999; Grasa y cols., 2006). No obstante, en ratón, los agonistas EP<sub>3</sub> actuando en receptores situados en las células intersticiales de Cajal intramusculares aumentan la

frecuencia de las contracciones peristálticas en el estómago (Forrest y cols., 2009). En la oveja no hemos detectado expresión del receptor EP<sub>1</sub> en las capas musculares del tracto GI, coincidiendo con lo descrito en conejo (Grasa y cols., 2006); sin embargo, dicho receptor sí está presente en las células musculares del intestino delgado y colon de rata (Ding y cols., 1997).

En nuestro trabajo, los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> se encontraron a lo largo de toda la **mucosa** GI. En el rumen, ambos receptores se localizaron en los estratos más basales del epitelio. El receptor EP<sub>2</sub> fue detectado en las glándulas del antro gástrico y en el epitelio de revestimiento intestinal. El receptor EP<sub>4</sub> se expresó en la región apical de los enterocitos intestinales y en células de tipo endocrino distribuidas por el epitelio del antro y duodeno. Nuestros resultados de western blotting utilizando muestras de mucosa duodenal aislada del resto de las capas mostraron que el receptor EP<sub>2</sub> era más abundante en la capa mucosa aislada en relación a la muscular, mientras que el receptor EP<sub>4</sub> era igual de abundante tanto en la mucosa aislada como en la muscular. Este resultado concuerda con nuestros experimentos de inmunohistoquímica, puesto que el receptor EP<sub>2</sub> tenía una expresión más abundante y homogénea a lo largo de toda la mucosa mientras que el receptor EP<sub>4</sub> aparecía restringido a células de tipo endocrino. En rata, ambos receptores están presentes en la mucosa gástrica y en células caliciformes del intestino delgado (Northey y cols. 2000; Ding y cols., 1997). En ratón, el receptor EP<sub>4</sub> está presente en la mucosa GI (Morimoto y cols., 1997), mientras que en conejo, el receptor EP<sub>2</sub> se encuentra en las células caliciformes del intestino (Grasa y cols., 2006). La presencia de estos receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> en células mucosas podría sugerir que la PGE<sub>2</sub> tiene un papel en la secreción GI de mucus. En la rata se ha descrito una acción dual de la PGE<sub>2</sub> sobre la secreción ácida gástrica, siendo inhibitoria a bajas concentraciones a través de receptores EP<sub>3</sub> y estimulatoria a concentraciones más altas a través de receptores EP<sub>4</sub> (Ding y cols., 1997). Ambos receptores están presentes en células parietales y células productoras de ácido de la mucosa gástrica en rata (Ding y cols., 1997).

Las mucinas son polímeros constituidos por glicoproteínas que son secretados por las células mucosas del estómago y las células caliciformes del intestino, formando una cubierta protectora sobre el revestimiento de la mucosa y constituyendo el principal componente de la respuesta inmune innata de la mucosa GI. La PGE<sub>2</sub> ha sido descrita como un potente secretagogo de mucina. (Tani y cols., 1997). Hassan y colaboradores (1996), establecieron que el receptor EP<sub>4</sub> expresado en células epiteliales gástricas en rata podría estar implicado en la estimulación de la secreción de mucus. De igual manera, Belly y Chade (1999), también han demostrado que la PGE<sub>2</sub> estimula la exocitosis de mucina dependiente de AMPc en colon de rata a través del receptor EP<sub>4</sub>. Por todo ello, al igual que en la rata, la interacción de la PGE<sub>2</sub> con los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> localizados en la mucosa GI podría estimular la producción de esta secreción mucosa protectora en la oveja.



La secreción de bicarbonato es una de las principales líneas de defensa de las células epiteliales contra el entorno ácido, manteniendo una zona neutra de pH por encima del revestimiento de la mucosa. En rata y ratón, la PGE<sub>2</sub> estimula la secreción de bicarbonato en el estómago a través del receptor EP<sub>1</sub> y en el duodeno a través del receptor EP<sub>3</sub> (Takeuchi y cols., 1999). Además, en rata, los receptores EP<sub>4</sub> también estimulan la secreción duodenal de bicarbonato (Aoi y cols., 2004).

Por otra parte, se conoce que el incremento en la producción de AMPc en las células del epitelio intestinal estimula la secreción e induce diarrea. Además, la PGE<sub>2</sub> induce secreción de cloruro en el intestino a través del mecanismo mediado por AMPc. Como los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> aumentan la concentración intracelular de AMPc y estos se encuentran en las células de la mucosa GI en la oveja, la PGE<sub>2</sub> podría estimular la secreción hidroelectrolítica a través de estos receptores, contribuyendo a evitar la invasión bacteriana en el tracto GI.

En el caso del subtipo EP<sub>4</sub>, observamos tinción en células que, por su morfología de lágrima, podrían ser de tipo **endocrino**, sugiriendo que la PGE<sub>2</sub> podría modular la liberación de hormonas GI a través de este receptor.

En el presente estudio, no hemos detectado expresión de los receptores EP<sub>1</sub> ni EP<sub>3</sub> en la mucosa GI de la oveja. Sin embargo, otros estudios localizan el mRNA de estos receptores en células mucosas del estómago de rata (Northey y cols. 2000) y los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> y EP<sub>3</sub> en células epiteliales de las vellosidades intestinales del conejo, especialmente en la membrana del borde en cepillo (Grasa y cols., 2006).

Las PGs endógenas desempeñan un papel importante en la modulación de la integridad de la mucosa, citoprotección y las diferentes funciones del aparato digestivo, siendo las PGs del tipo E las más efectivas en estas acciones. Así, bajas dosis de PGE<sub>2</sub> ejercen un efecto protector en un modelo de esofagitis en rata (Yamato y cols., 2005) y otorga citoprotección frente al daño inducido por etanol o indometacina en estómago de rata y ratón (Araki y cols. 2000; Suzuki y cols., 2001), efectos todos ellos mediados a través de receptores EP<sub>1</sub>. La PGE<sub>2</sub> ofrece citoprotección frente al daño inducido por indometacina en el intestino delgado de ratas a través de los receptores EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>. Además, los agonistas EP<sub>3</sub> disminuyen la secreción ácida gástrica (Kunikata y cols., 2002).

(Kunikata y cols, 2002) y también muestra un efecto curativo sobre úlceras gástricas y lesiones intestinales a través de la activación de receptores EP<sub>4</sub> (Takeuchi, 2010). Los mecanismos citoprotectores de la PGE<sub>2</sub> en el estómago e intestino delgado están relacionados con la inhibición de la contracción gástrica (EP<sub>1</sub>), la estimulación de la secreción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el duodeno (EP<sub>3</sub>/EP<sub>4</sub>), o la supresión de la invasión bacteriana por la inhibición de las contracciones intestinales (EP<sub>4</sub>) (Takeuchi, 2010).

### **5.2.3 EFECTO DEL LPS EN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs) EN EL HIPOTÁLAMO Y BULBO RAQUÍDEO**

En nuestro trabajo no hemos detectado por WB e IHC cambios en la expresión de los receptores EP en el hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja tras la administración iv de LPS (0.1 µg/kg). En consonancia con nuestros resultados, un estudio realizado en ratón describe que la distribución y expresión del receptor EP<sub>3</sub> en el área preóptica del hipotálamo no se modifica por la administración periférica de LPS (0.1 mg/kg, intraperitoneal) (Vasilache y cols., 2007).

Sin embargo, otros estudios muestran variaciones en la expresión de los receptores EP en el SNC tras la administración de LPS o citocinas. En conejos, la administración iv de IL-1β a dosis que inducen fiebre, aumenta la expresión del mRNA del receptor EP<sub>3</sub> en el área preóptica del hipotálamo (Dong y cols., 2007).

En rata, la administración iv de LPS e IL-1β aumenta la expresión de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> en poblaciones neuronales muy localizadas. Concretamente, se describe un aumento del mRNA del receptor EP<sub>4</sub> en neuronas del núcleo parvocelular productoras del CRF, así como en neuronas catecolaminérgicas del núcleo del tracto solitario, locus ceruleus y médula ventrolateral., indicando una posible función de este receptor en la mediación de los efectos de la PGE<sub>2</sub> en diferentes funciones autonómicas y neuroendocrinas. El mRNA del receptor EP<sub>2</sub> aumenta en el área postrema, órgano subfornical, núcleo central de la amígdala y leptomeninges (Zhang y Rivest, 1999). Otros autores describen en rata una estimulación de los mecanismos neurales centrales, incluyendo las neuronas secretoras del CRF, cuando aumentan los niveles circulantes de IL-1β, pero en este caso a través de la activación del receptor EP<sub>3</sub> (Ek y cols., 2000).

También se han descrito alteraciones en la expresión de los receptores EP en el SNC en condiciones patológicas. En el cerebro sólo se ha observado expresión de los receptores EP en neuronas. Los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> se encuentran en grupos concretos de neuronas, mientras que el receptor EP<sub>3</sub> se localiza por todo el cerebro (Nakamura y cols., 2000). En rata, en circunstancias neurodegenerativas como una lesión excitotóxica aguda inducida por la administración central de ácido quinolínico, se produce una pérdida de neuronas positivas al receptor EP<sub>3</sub>, mientras que aparecen células de la microglía positivas a dicho receptor. La activación del receptor EP<sub>3</sub> disminuye la síntesis de AMPc, contrarrestando el aumento de AMPc inducido por el receptor EP<sub>2</sub>, el cual media los efectos anti-inflamatorios de las PGs. Los autores sugieren que el aumento de la expresión del receptor EP<sub>3</sub> en la microglía podría participar en la activación aguda o crónica de este tipo celular en varias enfermedades cerebrales como la isquemia o la enfermedad de Alzheimer (Slawik y cols., 2004). Un

aumento en la expresión del mRNA de los receptores EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> en la médula espinal también se describe en las lesiones de un modelo experimental de encefalomiелitis autoimmune en ratón, que se correlaciona con los síntomas clínicos y la severidad de la enfermedad (Kihara y cols., 2009).

#### 5.2.4 EFECTO DEL LPS EN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs) EN EL TRACTO GI

Nuestro estudio mostró que el tratamiento iv de las ovejas con LPS (0,1 µg/kg) durante 1 ó 4 horas no modificó la expresión de los receptores de la PGE<sub>2</sub> en ninguno de los órganos GI estudiados.

La expresión de los receptores de la PGE<sub>2</sub> cambia en determinados **procesos fisiológicos** como en el parto. Así, en el tracto genital de la oveja, el estradiol, una hormona que aumenta sus concentraciones en plasma durante el parto, disminuye la expresión de los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> en los vasos sanguíneos del útero. Como son vasoconstrictores, este efecto podría facilitar los efectos vasodilatadores de la PGE<sub>2</sub> a través de EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> (Schmitz y cols., 2006). En rata, el estradiol disminuye la expresión del receptor EP<sub>1</sub> en la capa muscular longitudinal uterina, lo que podría explicar el descenso en la respuesta contráctil del cuello uterino a la PGE<sub>2</sub> observado al final de la gestación (Hollingston e Isherwood, 1978) y que podría contribuir a una mejor dilatación del cérvix durante el parto. Así mismo, también se observa que la progesterona aumenta la expresión del mRNA del receptor EP<sub>2</sub> en el miometrio de ratas (Dong y Yallampalli, 2000). En perros, la castración disminuye la expresión de los receptores de la PGE<sub>2</sub> en el tracto urinario inferior, especialmente en la uretra proximal (Ponglowhapan y cols., 2010).

También hay grandes cambios de expresión de los receptores de la PGE<sub>2</sub> en procesos patológicos. Se ha propuesto que los receptores EP<sub>2</sub> estarían relacionados con la **apoptosis de células epiteliales**, ya que aumenta su expresión en estos casos. Así, en el yeyuno y colon de ratones dañados por radiación aumenta la expresión de EP<sub>2</sub>, disminuyendo la de EP<sub>4</sub> (Houchen y cols., 2003). En pacientes con carcinoma esofágico de células escamosas aumenta la expresión del receptor EP<sub>2</sub> (Kuo y cols., 2009), mientras que en tumores de colon en ratón, rata y hombre aumenta la expresión de los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>2</sub>, disminuyendo la del receptor EP<sub>3</sub> (Shoji y cols., 2004). En las células epiteliales de las criptas del intestino delgado de pacientes con enfermedad celíaca se detecta expresión de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub>, mientras que éstos no se observan en tejidos sanos (Olsen Hult y cols., 2011).

En **procesos inflamatorios** aumenta la producción de PGE<sub>2</sub>, pero sus efectos en la respuesta inflamatoria varían dependiendo de sobre qué receptor actúe (Narumiya y cols., 1999; Nataraj y cols., 2001). Parece haber diversos factores que determinan el carácter pro- o

antiinflamatorio de la PGE<sub>2</sub>, de los cuales la expresión de los receptores EPs en células diana es crítica. Otro aspecto son las citocinas implicadas, ya que la misma citocina puede tener efectos opuestos dependiendo del tipo de respuesta inflamatoria. Además, la COX-2, la iNOS, el NF-κB y el IFN-γ pueden ser pro- o antiinflamatorios dependiendo de la fase de la inflamación, por lo que es probable que los efectos de la interacción PGE<sub>2</sub>-receptores EP en la expresión de estos agentes inflamatorios dependa también de la fase en la que se encuentre la inflamación (Akaogi y cols., 2004). Así, en un modelo de artritis/lupus en ratón se observó que la inflamación aumenta la expresión del mRNA de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub>, así como el de las enzimas proinflamatorias COX-2 y sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) en los macrófagos peritoneales. Estos receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> parecen tener un efecto antiinflamatorio, disminuyendo los niveles del TNF-α y aumentando la producción de IL-6, por lo que representaría un mecanismo de retroalimentación negativa que limita la respuesta inflamatoria (Akaogi y cols., 2004).

Aumentos en la expresión de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> también se han descrito en otros modelos inflamatorios en la **córnea** en ratón (Liclican y cols., 2010), así como del EP<sub>4</sub> en la mucosa de la **vejiga de la orina** (Chuang y cols., 2009) o en **neuronas** del ganglio de la raíz dorsal (Chung-Ren y cols., 2006) en rata.

También en casos de **inflamación del tracto GI** se han detectado variaciones en la expresión de los receptores de la PGE<sub>2</sub>. En la mucosa del colon de sujetos sanos, los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>3</sub> sólo se expresan en el epitelio del ápice de las criptas, mientras que en pacientes de colitis también se encuentran a lo largo de todo el epitelio lateral de las criptas. Ello aumentaría la función de barrera del epitelio durante la inflamación, extendiendo la acción de la PGE<sub>2</sub> desde el ápice las criptas al resto del epitelio (Takafuji y cols., 2000). En la mucosa del colon sano tanto en el hombre como en la rata, los receptores EP<sub>4</sub> se localizan en la membrana apical de las células epiteliales del extremo de los pliegues de la mucosa, mientras que en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y en ratas con colitis inducida con sulfato sodio dextrano (DSS), se sobreexpresan de forma difusa en toda la mucosa. En cultivos en monocapa de células epiteliales de colon, la exposición apical a altos niveles de PGE<sub>2</sub> reduce la integridad de la barrera a través de receptores EP<sub>4</sub> (Lejeune y cols., 2010). Por otra parte, el receptor EP<sub>4</sub> se ha relacionado con el mantenimiento de la homeostasis intestinal mediante la preservación de la integridad de la mucosa. Tanto en ratones EP<sub>4</sub><sup>-/-</sup> como en ratones *wild-type* tratados con un antagonista de este receptor (ONO-AE3-208), se describe una susceptibilidad al desarrollo de colitis en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal (Narumiya, 2003).

En macrófagos de ratón, el LPS y la PGE<sub>2</sub> aumentan la expresión del mRNA del receptor EP<sub>2</sub>, mientras que disminuye la del EP<sub>4</sub> y no se modifica para los EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> (Ikegami y cols., 2001; Díaz-Muñoz y cols., 2012). La sobreexpresión del receptor EP<sub>2</sub> aumenta el

mRNA de la COX-2 y de la mPGES-1, resultando en una retroalimentación positiva que producirá más PGE<sub>2</sub> (Díaz-Muñoz y cols., 2012).

Sin embargo, en nuestro modelo experimental en la oveja, la administración iv de bajas dosis de LPS que inducen fiebre y alteran la motilidad GI no son capaces de modificar la expresión de los receptores EP en el tracto GI. Por los trabajos previamente descritos se puede deducir que para alterar la expresión de los receptores de la PGE<sub>2</sub> es necesario un daño al menos de tipo inflamatorio. En nuestro caso, la ausencia de alteración en los receptores EP podría deberse a que las dosis de LPS utilizadas sólo inducen efectos agudos y no crónicos como los necesarios para desencadenar un proceso inflamatorio. Así, la expresión de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> y de la COX-2 aumenta en la **córnea** de ratones con inflamación crónica, mientras que no se alteran con una lesión aguda por abrasión (Liclican y cols., 2010).

### **5.2.5 PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE LA PGE<sub>2</sub> (EPs) EN LA FIEBRE Y LAS ALTERACIONES MOTORAS GI INDUCIDAS POR EL LPS**

En nuestro modelo experimental en la oveja, la administración icv del agonista EP<sub>3</sub> sulprostona reprodujo todos los efectos inducidos por la inyección iv de LPS, ya que aumentó la temperatura corporal, disminuyó la actividad mioeléctrica del antro e intestino delgado y aumentó la frecuencia de las fases III del MMC. Sin embargo, su administración iv no produjo ningún efecto. Estos resultados sugieren que la endotoxina actúa a través de la liberación de PGs en el SNC, las cuales activan los receptores EP<sub>3</sub>.

Por otra parte, la administración icv del agonista EP<sub>1</sub> 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida también indujo fiebre y disminuyó la actividad mioeléctrica GI como el LPS, por lo que se podría pensar que el receptor EP<sub>1</sub> también podría estar implicado en los efectos de la endotoxina. Sin embargo, para observar estos efectos fueron necesarias dosis (8 nmol/kg) 20 veces mayores que las del agonista EP<sub>3</sub> sulprostona (0.4 nmol/kg), resultando en un efecto de una intensidad y duración mucho menores que los inducidos por la sulprostona. Además, aunque el 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida indujo una fase III inicial no modificó posteriormente la frecuencia de los MMCs. Si tenemos en cuenta que este agonista EP<sub>1</sub> también actúa como agonista débil del receptor EP<sub>3</sub> (Woodward y cols., 2011), posiblemente los efectos que hemos observado en la temperatura corporal y la motilidad GI tras su administración icv con la dosis más alta sean debidos a su interacción débil con receptores EP<sub>3</sub>.

En cuanto al agonista EP<sub>2</sub> butaprost, su administración icv o iv no alteró la temperatura corporal ni la motilidad GI, por lo que parece que este receptor no participaría en los efectos inducidos por la endotoxina.

La administración icv del agonista EP<sub>4</sub> L-902,688, reprodujo la fiebre y las alteraciones motoras GI inducidas por el LPS iv, al igual que lo descrito previamente para el agonista EP<sub>3</sub> sulprostona. Además, las dosis necesarias para producir estos efectos eran similares a las de la sulprostona. La administración iv de L-902,688 no produjo ningún efecto, corroborando que las acciones de este agonista eran a nivel del SNC..

Previamente hemos demostrado que en la oveja el LPS induce fiebre y altera la motilidad GI a través de la liberación consecutiva en el SNC de citocinas (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y de PGs (Plaza y cols., 1997b; Guerrero y cols., 2003). Con los datos presentados en este trabajo sugerimos que el LPS actúa a través de la activación en el SNC de los receptores EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> de la PGE<sub>2</sub>.

Existen diferencias en los efectos inducidos por la administración icv de los agonistas de la PGE<sub>2</sub> y los producidos por la inyección iv de LPS. Así, la primera indujo sus efectos antes que el LPS. El agonista, una vez en el líquido cefalorraquídeo tarda un tiempo en llegar a la zona donde activa los receptores, ya que previamente debe difundir en el líquido cefalorraquídeo, cuya circulación es lenta, y entrar en el parénquima cerebral hasta sus células diana. Si aún así tarda menos tiempo en producir los efectos que el LPS iv refuerza la hipótesis de que la activación por el LPS de los receptores EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> en el SNC supone el final de una cascada de mediadores liberados por la endotoxina. Además, los agonistas EP indujeron una respuesta monofásica en lugar de bifásica como el LPS. Ésto puede ser debido a que en la respuesta al LPS participa la activación secuencial de varias vías fisiopatológicas que pueden liberar mediadores en dos oleadas induciendo la respuesta bifásica, mientras que la administración icv de los agonistas EP activa únicamente el paso final de dichas vías. Por último, la respuesta a la administración icv de los agonistas EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> fué más duradera que la inducida por el LPS iv. Esto probablemente sea debido a que el LPS induce la liberación de pequeñas cantidades de PGE<sub>2</sub> en puntos concretos del cerebro, que posteriormente son metabolizadas, finalizando el efecto. En el caso de los agonistas EP, se administraron en el líquido cefalorraquídeo, distribuyéndose por todo el SNC, de manera que su metabolización y eliminación será más lenta que la que sufre la PGE<sub>2</sub> endógena liberada por el LPS.

Se ha propuesto que la PGE<sub>2</sub> en el cerebro es uno de los principales mediadores de la **fiebre**. Así, la hipertermia inducida por la administración central de PGE<sub>2</sub> ha sido previamente estudiada en varias especies, como rata (Förstermann y cols., 1983), cerdo (Parrott y Vellucci, 1996), conejo (Morimoto y cols., 1988a y b) y oveja (Guerrero, 2002). En todas estas especies, la administración icv de PGE<sub>2</sub> produce una respuesta de hipertermia dosis dependiente.

Los sitios sensibles a la hipertermia inducida por esta PG están localizados exclusivamente en la región que incluye el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) y rodeando el área preóptica (POA) del hipotálamo. En el ratón, de los cuatro receptores de la

PGE<sub>2</sub>, en el POA se han localizado el EP<sub>1</sub>, el EP<sub>3</sub> y el EP<sub>4</sub> (Oka y cols., 2000). Sin embargo, la participación de los diferentes receptores en la respuesta febril varía de unas especies a otras. Una posible explicación ante estos resultados contradictorios podría ser la diferencia en la distribución y en la función de los receptores EP entre las distintas especies.

Así, en la rata se ha demostrado el papel de los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> en la producción de fiebre. La administración icv de 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> etil amida (agonista EP<sub>1</sub> y de la isoforma  $\alpha$  del EP<sub>3</sub>) y de ONO-AE-248 (agonista específico EP<sub>3</sub>) reproduce la hipertermia producida por la PGE<sub>2</sub> icv (Oka y Hori, 1994; Oka y cols., 2003b). Sin embargo, cada receptor contribuye de forma diferente en el curso de la fiebre, de forma que la respuesta mediada por EP<sub>1</sub> alcanza su pico a los 30-50 min y se reduce a la mitad a los 100 min, mientras que la producida por la estimulación de EP<sub>3</sub> alcanza su máximo a los 100 min. Estos autores describen que en esta especie, el receptor EP<sub>4</sub>, por el contrario, media una respuesta de hipotermia.

El receptor EP<sub>3</sub> está expresado de forma abundante en neuronas del núcleo preóptico medial de la rata, las cuales se proyectan directamente hacia el hipotálamo dorsomedial y al núcleo pálido del rafe, sitios cerebrales que proporcionan señales excitatorias a los efectores térmicos regulados por el sistema nervioso simpático que son esenciales en las respuestas febriles, como son el tejido adiposo marrón y los vasos sanguíneos cutáneos (Nakamura y cols., 1999). En la rata, cuando la PGE<sub>2</sub> se forma en los microvasos cerebrales del OVLT, penetra en el parénquima cerebral y actúa sobre los receptores EP<sub>3</sub> de neuronas del área preóptica. Este estímulo inhibe la transmisión GABAérgica inhibitoria de estas neuronas, conduciendo a la estimulación simpática de tejidos periféricos (Tsuchiya y cols., 2008).

Estudios realizados utilizando ratones *knockout* muestran que, tan sólo aquellos ratones deficientes para el receptor EP<sub>3</sub>, no desarrollan respuesta febril cuando se les administra PGE<sub>2</sub> icv, IL- $\beta$  iv e icv o LPS iv o ip (Ushikubi y cols., 1998; Matsuoka y cols., 2005). La pérdida selectiva de los receptores EP<sub>3</sub> en el núcleo preóptico medial no afecta a la t<sup>a</sup> basal, pero previene la fiebre inducida por PGE<sub>2</sub> o LPS. Además, la fiebre es producida por la microinyección de PGE<sub>2</sub> en el área preóptica pero no en otras zonas cerebrales que expresan receptores EP<sub>3</sub>. Por ello, se ha propuesto que en el ratón, la fiebre es inducida por estas neuronas que expresan el receptor EP<sub>3</sub> en el núcleo preóptico medial (Lazarus y cols., 2007).

En la rata, dos horas tras la administración iv de 5  $\mu$ g/kg de LPS, se observa inmunoreactividad de Fos (marcador de actividad neuronal) en los núcleos hipotalámicos preópticos medial y ventromedial, así como en el paraventricular, colocalizándose con una intensa expresión del mRNA del receptor EP<sub>4</sub>. El mRNA del receptor EP<sub>3</sub> sólo se detecta en el núcleo preóptico medial y muestra escasa coexpresión con Fos. Por tanto, estos autores indican que las neuronas que expresan el receptor EP<sub>4</sub> se activan durante la fiebre inducida por LPS (Oka y cols., 2000). No obstante, posteriormente el mismo grupo demuestra que el



agonista EP<sub>4</sub> ONO-AE1-329 icv disminuye la temperatura corporal en rata y sugieren que tanto el receptor EP<sub>3</sub> como el EP<sub>4</sub> se localizan en el área preóptica, pero poseen diferentes mecanismos de acción: mientras el EP<sub>3</sub> inhibe la adenilato ciclasa, el EP<sub>4</sub> la estimula, por lo que cabría esperar que los agonistas de dichos receptores ejercieran efectos opuestos en las mismas neuronas (Oka y cols., 2003b). En ratón, el agonista EP<sub>4</sub> AE1-329 (300 µg/kg, sc) disminuye la expresión de genes proinflamatorios inducida por el LPS en el hipocampo y en microglía aislada, así como los niveles en plasma de citocinas proinflamatorias, indicando que la activación del receptor EP<sub>4</sub> periférico protege al cerebro de la inflamación sistémica (Shi y cols., 2010).

Estudios en cerdo muestran que la administración central del agonista EP<sub>1</sub> 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> no produce un cambio significativo en la temperatura corporal, mientras que el agonista EP<sub>2</sub> butaprost y el agonista EP<sub>2</sub>/EP<sub>3</sub> 11-deoxy,16,16-dimethyl PGE<sub>2</sub> inducen efectos febriles similares, concluyendo que en cerdo los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>3</sub> son necesarios para la producción de fiebre (Parrot y Vellucci, 1996).

Parece por tanto que la fiebre es inducida por la activación de los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> en la rata, los EP<sub>3</sub> en el ratón y EP<sub>2</sub> y EP<sub>3</sub> en el cerdo. En los tres casos coincide la implicación de los receptores EP<sub>3</sub>, tal como hemos mostrado en la oveja. Sin embargo, el resultado más novedoso es la participación clara del receptor EP<sub>4</sub> en la oveja, ya que lo único que se ha descrito de éste en otros modelos experimentales es que inhibe la fiebre en la rata o es antiinflamatorio en el ratón.

En cuanto a las alteraciones en la **motilidad GI** provocadas por el LPS en la oveja, hemos observado que son paralelas a la fiebre, de manera que están involucrados a nivel del cerebro los mismos receptores de la PGE<sub>2</sub>: EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> en ambos efectos.

Tan sólo hemos encontrado en la bibliografía un estudio que aporta información sobre la participación de los receptores EP en el SNC regulando la motilidad GI y se trata de un estudio en ratón centrado en el control de la ingesta que trata el vaciamiento gástrico como secundario (Ohinata y cols., 2006). En este trabajo, la administración icv del agonista EP<sub>4</sub> ONO-AE1-329 a 10 nmoles/ratón retrasa el vaciamiento gástrico y eleva la glucosa sanguínea, mientras que a dosis menores (1-10 nmoles/ratón) produce un efecto anoréxico, suprimiendo la ingesta de comida, algo que también sucedía en nuestros experimentos durante el proceso febril.

En relación con la regulación de la motilidad GI no hemos encontrado ninguna referencia bibliográfica sobre el papel que desempeñan los receptores EP a nivel del SNC. Los trabajos publicados sólo se refieren a la participación de los receptores EP periféricos localizados en tejidos del tracto GI. Así, clásicamente, los efectos contráctiles de la PGE<sub>2</sub> sobre el tracto GI se han relacionado con su interacción con los receptores EP<sub>1</sub> y/o EP<sub>3</sub>. Por el

contrario, los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> inducen relajación del músculo liso GI puesto que su activación estimula la adenilato ciclasa, incrementando el AMPc intracelular (Okada y cols., 2000; Lin y cols., 2012).

Mediante el uso de ratones *knockout* para los diferentes receptores de prostanoïdes, se describe que los receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> median las contracciones inducidas por la PGE<sub>2</sub> en el músculo liso longitudinal del ileon de ratón (Okada y cols., 2000). En cobayas, la PGE<sub>2</sub> y los agonistas EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> y sulprostona producen contracciones en el músculo liso longitudinal del ileon (Lawrence y cols., 1992), mientras que la sulprostona estimula la contracción del músculo liso circular e incrementa la peristalsis en el yeyuno e íleon. En cambio, el agonista EP<sub>2</sub> butaprost disminuye la peristalsis (Shahbazian y cols., 2002). En el intestino delgado de conejo, las contracciones inducidas por la PGE<sub>2</sub> son debidas a la activación de receptores EP<sub>3</sub> localizados tanto en células musculares lisas como en neuronas mientéricas (Grasa y cols., 2006). En el músculo liso longitudinal del colon humano, la PGE<sub>2</sub> induce contracciones a través de receptores EP<sub>1</sub>, mientras que en colon e íleon de ratón es a través de receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub>. En estos tejidos, el receptor EP<sub>2</sub> induce relajación (Fairbrother y cols., 2011). La activación del receptor EP<sub>2</sub> inhibe las contracciones inducidas por CCK-8 en células del músculo liso circular del ileon de cobayas y cerdo, así como en colon de perro (Botella y cols., 1993; 1995). Sin embargo, en conejo el agonista EP<sub>2</sub> butaprost no altera la contractilidad del músculo liso longitudinal del intestino delgado (Grasa y cols., 2006). Además en la rata, la administración iv de 3 µg/kg del agonista EP<sub>4</sub> ONO-AE1-329 inhibe la motilidad intestinal (Kunikata y cols., 2002).

Con respecto a las alteraciones de la motilidad GI inducidas por el LPS tampoco hemos encontrado trabajos en los que se estudie la participación de los receptores EP a nivel cerebral. En rata, la estimulación con LPS aumenta la expresión de las proteínas COX-2 e iNOS en macrófagos residentes ED2 positivos de la capa muscular intestinal (Eskandari y cols., 1999; Hori y cols., 2001). En el ratón, la estimulación *in vitro* del íleon con LPS (1 µg/ml) aumenta la expresión de la COX-2. Las PGs producidas, a su vez, estimulan los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> de los macrófagos residentes de la capa muscular intestinal y aumenta en éstos la expresión de la iNOS. El NO producido será responsable de la dismotilidad intestinal inducida por el tratamiento *in vitro* con LPS (Tajima y cols., 2012).

Por otra parte, la PGE<sub>2</sub>, actuando por medio de sus cuatro subtipos de receptores EP, está involucrada en **respuestas de estrés y de agresividad**. En ratones se ha observado que la activación del receptor EP<sub>1</sub> suprime los comportamientos impulsivos y de estrés a través de vías dopaminérgicas (Furuyashiki y Narumiya, 2009, 2011; Tanaka y cols., 2012). Así, el LPS ip disminuye el nivel de interacción social, pero en ratones *knock out* para el receptor EP<sub>1</sub>, además provoca comportamientos agresivos (Matsuoka y cols., 2005). En nuestro trabajo en oveja, la administración icv de 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> (agonista EP<sub>1</sub> y en menor

medida EP<sub>3</sub>) y de sulprostona (agonista EP<sub>3</sub> y en menor medida EP<sub>1</sub>) inducía en los animales una sintomatología nerviosa muy marcada (estaban inquietas, emitían balidos de forma muy frecuente, dirigían las orejas hacia detrás, escarbaban el suelo, cambiaban constantemente de postura y tenían ligeros temblores en la parte trasera del cuerpo). Además, es de destacar el hecho de que el 17-fenil trinor PGE<sub>2</sub> producía estos efectos comportamentales a dosis que no alteraban la temperatura corporal o la motilidad gastrointestinal, lo que apoyaría la hipótesis de que este agonista actuaría a dosis bajas sobre receptores EP<sub>1</sub> produciendo la sintomatología nerviosa y a dosis elevadas sobre receptores EP<sub>3</sub> para alterar la temperatura corporal y la motilidad gastrointestinal. Por ello, en oveja el receptor EP<sub>1</sub> podría participar en las respuestas comportamentales relacionadas con el estrés, pero al contrario que en el ratón, la activación del receptor EP<sub>1</sub> induce este tipo de respuestas en lugar de bloquearlas.



## **6.- CONCLUSIONES**



1.- La hipertermia y las alteraciones motoras gastrointestinales inducidas por el LPS en la oveja son bloqueadas por la administración endovenosa de inhibidores de los macrófagos, sugiriendo que el LPS actúa a través de la estimulación de estas células a nivel periférico.

2.- La COX-1 y la COX-2 se expresan en células endoteliales vasculares del hipotálamo y del bulbo raquídeo. La COX-1 también se encuentra en células de tipo microglía/macrófagos distribuidas por el parénquima encefálico, así como en macrófagos perivascuales. La COX-2 se expresa en neuronas, especialmente en el área preóptica del hipotálamo y en los núcleos paraventricular y ventromedial. El tratamiento con LPS aumenta el número de macrófagos perivascuales y estimula la expresión de la COX-2 en dichas células. Estos macrófagos aparecen en mayor proporción en el órgano vascular de la lámina terminal y en el núcleo preóptico medial. El LPS también induce la expresión de COX-2 en la microglía reactiva del hipotálamo y en las neuronas de los núcleos paraventricular y ventromedial.

3.- La COX-1 y COX-2 también se expresan en células endocrinas del epitelio de los conductos biliares y bronquiales. La COX-2 aparece en células de Kupffer de los sinusoides y espacios portales hepáticos y en macrófagos aislados distribuidos por el parénquima pulmonar. El LPS aumenta el número de macrófagos hepáticos y pulmonares e induce la expresión de la COX-2 en ellos, así como la de COX-1 en macrófagos pulmonares.

4.- La administración endovenosa de agonistas de los receptores EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub> de la PGE<sub>2</sub> reproducen la hipertermia y las alteraciones motoras gastrointestinales inducidas por el LPS, lo que sugiere su participación en los trastornos producidos por la endotoxina. El receptor EP<sub>1</sub> participa en el comportamiento (reacciones de estrés). Sin embargo, el receptor EP<sub>2</sub> no parece estar implicado en ninguno de estos efectos.

5.- En condiciones fisiológicas, los cuatro receptores de la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>) se expresan en el rumen, antro abomasal, duodeno, hipotálamo y bulbo raquídeo de la oveja. Todos ellos se inmunolocalizan en neuronas del hipotálamo, bulbo raquídeo, así como de los plexos mientérico y submucoso del tracto gastrointestinal. En rumen, antro e intestino, el receptor EP<sub>3</sub> se localiza en las capas musculares lisas circular y longitudinal, mientras que los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> se expresan en la mucosa. En el antro y duodeno, el EP<sub>4</sub> se localiza también en células con morfología endocrina. En nuestro modelo, la administración de LPS no modifica la expresión de los receptores en ninguno de los tejidos estudiados.





## **7.- BIBLIOGRAFÍA**



- ADAWI A., ZHANG Y., BAGGS R., FINKELSTEIN J., PHIPPS R.P. (1998) - Disruption of the CD40-CD40 ligand system prevents an oxygen-induced respiratory distress syndrome. *Am. J. Pathol.*, **152**: 651-57.
- AHMAD N., CHEN L.C., GORDON M.A., LASKIN J.D., LASKIN D.L. (2002) - Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.*, **71**: 1005-11.
- AHRENSTEDT O., HALLGREN R., KNUTSON L. (1994) - Jejunal release of prostaglandin E<sub>2</sub> in Crohn's disease: relation to disease activity and first-degree relatives. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **9**: 539-543.
- AIZAWA I., ITOH Z., HARRIS V., UNGER R.H. (1981) - Plasma somatostatin-like immunoreactivity during the interdigestive period in dog. *J. Clin. Invest.*, **68**: 206-13.
- AKAOGI J., YAMADA H., KURODA Y., NACIONALES DC., REEVES WH., SATOH M. (2004) - Prostaglandin E<sub>2</sub> receptors EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristane-treated mice and modulate TNF-alpha and IL-6 production. *J. Leukoc. Biol.*, **76**: 227-36.
- AKARSU E.S., AYHAN I.H. (1993) - Iloprost, a stable analogue of PGI<sub>2</sub>, potentiates the hyperthermic effect of PGE<sub>2</sub> in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **46**: 383-9.
- AKASHI S., SHIMAZU R., OGATA H., NAGAI Y., TAKEDA K., KIMOTO M., MIYAKE K. (2000) - Cell surface expression and lipopolysaccharide signalling via the Toll like receptor 4-MD2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **164**: 3471-75.
- ALCÓN S. (2000) - Vías de acoplamiento estímulo-contracción en la vesícula biliar. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- ALDSTEIN R.S., SELLERS J.R. (1996) - Myosin Structure and Function. En: Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. Bárány, M. 1ª ed. Ed. Academic Press. San Diego. pp: 3-19.
- ANGELOV D.N., WALTHER M., STREPPPEL M., GUNTINAS-LICHIUS O., NEISS W.F. (1998) - The cerebral perivascular cells. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, **147**: 1-87.
- AOI M., AIHARA E., NAKASHIMA M., TAKEUCHI K. (2004) - Participation of PGE<sub>2</sub> receptor EP<sub>4</sub> subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **287**: 96-103.
- ARAKI H., UKAWA H., SUGAWA Y., YAGI K., SUZUKI K., TAKEUCHI K. (2000) - The roles of prostaglandin E receptor subtypes in the cytoprotective action of PGE<sub>2</sub> in rat stomach. *Aliment Pharmacol. Ther.*, **14**: 116-24.
- ASTLE S., THORNTON S., SLATER D.M. (2005) - Identification and localization of prostaglandin E<sub>2</sub> receptors in upper and lower segment human myometrium during pregnancy. *Mol. Hum. Reprod.*, **11**: 279-87.
- ATWAL O., SALDANHA K. (1985) - Erythrophagocytosis in alveolar capillaries of goat lung: ultrastructural properties of blood monocytes. *Acta Anat. (Basel)*, **124**: 245-254.
- AWQATI Q., FIELD M., PIERCE N.F., GREENOUGH W.B. (1970) - Effect of prostaglandin E<sub>1</sub> on electrolyte transport in rabbit ileal mucosa. (Abstr.) *J. clin. Invest.*, **49**: 2a.

- AWQATI Q., GREENOUGH W.B. (1972) - Prostaglandins inhibit intestinal sodium transport. *Nature [new Biol.]*, **238**: 26-27.
- BANKS W.A., KASTIN A.J., DURHAM D.A. (1989) - Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *Brain Res. Bull.*, **23**: 433-7.
- BANKS W.J. (1986) - Histología veterinaria aplicada. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. Mexico D.F.
- BELLEY A., CHADEE K. (1999) - Prostaglandin E(2) stimulates rat and human colonic mucin exocytosis via the EP(4) receptor. *Gastroenterology*, **117**: 1352-62.
- BENNET A., FLESCHER B. (1970) - Prostaglandins and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, **59**: 790-800.
- BENNETT A., ELEY K.G., SCHOLLES G. B. (1968a) - Effect of prostaglandins E1, and E2, on intestinal motility in the guinea-pig and rat. *Brit. J. Pharmacol.*, **34**: 639-647
- BENNETT A., ELEY K.G., SCHOLLES G. B. (1968b) - Effects of prostaglandins E1, and E2 on human, guinea-pig and rat isolated small intestine. *Brit. J. Pharmacol.*, **34**: 630-638.
- BENNETT A., ELEY K.G., STOCKLEY H.L. (1975) - The effects of prostaglandins on guinea-pig isolated intestine and their possible contribution to muscle activity and tone. *Br. J. Pharmacol.*, **54**: 197-204.
- BHATTACHARYA M., PERI K., ALMAZAN G., RIBEIRO-DA-SILVA A., SHICHI H., DUROCHER Y. (1998) - Nuclear localization of prostaglandin E<sub>2</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 15792-15797.
- BIOULAC-SAGE P., KUIPER J., T. J. C. VAN BERKEL T.J.C., BALABAUD C. (1996) - Lymphocyte and macrophage populations in the liver. *Hepatogastroenterology*, **43**: 4-14.
- BLATTEIS C.M. (2007) - The onset of fever: new insights into its mechanism. *Prog. Brain Res.*, **162**: 3-14.
- BLATTEIS C.M., BEALER S.L., HUNTER W.S., LLANOS-Q J., AHOKAS R.A., MASHBURN T.A. Jr. (1983) - Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res. Bull.*, **11**: 519-26.
- BLATTEIS C.M. (2006) - Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol. Ther.*, **111**: 194-223.
- BOLDYREFF V. (1902) - Periodic wave phenomena in the secretory function of the digestive tract. *Gaz. Hop. Botkine* **34**: 1529-42.
- BONNANS C., FUKUNAGA K., LEVY M.A., LEVY B.D. (2006) - Lipoxin A4 regulates bronchial epithelial cell responses to acid injury. *Am. J. Pathol.*, **168**: 1064-72.
- BONNER J.C., RICE A.B., INGRAM J.L., MOOMAW C.R., NYSKA A., BRADBURY A., SESSOMS A.R., CHULADA P.C., MORGAN D.L., ZELDIN D.C., LANGERBACH R. (2002) - Susceptibility of cyclooxygenase-2 deficient mice to pulmonary fibrogenesis. *Am. J. Pathol.*, **161**: 459-70.
- BORDA J.T., ALVÁREZ X., MOHAN M., HASEGAWA A., BERNARDINO A., JEAN S., AYE P., LACKNER A.A. (2008) - CD163, a marker of perivascular macrophages, is up-regulated by microglia in simian immunodeficiency virus encephalitis after haptoglobin-hemoglobin complex stimulation and is suggestive of breakdown of the blood-brain barrier. *Am. J. Pathol.*, **172**: 725-37.

- BOTELLA A., DELVAUX M., FIORAMONTI J., FREXINOS J., BUENO L. (1993) - Stimulatory (EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub>) and inhibitory (EP<sub>2</sub>) prostaglandin E<sub>2</sub> receptors in isolated ileal smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, **237**: 131-7.
- BOTELLA A., DELVAUX M., FIORAMONTI J., FREXINOS J., BUENO L. (1995) - Receptor subtypes involved in dual effects induced by prostaglandin E<sub>2</sub> in circular smooth muscle from dog colon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**: 1008-14.
- BRAIN J. B., MOLINA R. M., DECAMP M. M., WARNER A. E. (1999) - Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **276**: 146-154.
- BRANNON T.S., MACRITCHIE A.N., JARAMILLO M.A., SHERMAN T.S., YAHANNA I.S., MARGRAF L.R., SHAUL P.W. (1998) - Ontogeny of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 gene expression in ovine lung. *Am. J. Physiol.*, **274**: 66-71.
- BREDER C.D., DEWITT D., KRAIG R.P. (1995) - Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **355**: 296-315.
- BREDER, C.D., SMITH, W.L., RAZ, A., MASFERRER, J., SEIBERT, K., NEEDLEMAN, P., SAPER, C.B. (1992) - Distribution and characterization of cyclooxygenase immunoreactivity in the ovine brain. *J. Comp. Neurol.*, **322**: 409-38.
- BREYER M.D., BREYER R.M. (2000) - Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **279**: 12-13.
- BREYER M.D., DAVIS H.R., JACOBSON H.R., BREYER R.M. (1996) - Differential localization of prostaglandin E receptor subtypes in human kidney. *Am. J. Physiol.*, **270**: 912-918.
- BREYER M.D., JACOBSON H.R., DAVIS L.S., BREYER R.M. (1993) - In situ hybridization and localization of mRNA for the rabbit prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor. *Kidney Int.*, **43**: 1372-1378.
- BRITT R.D., LOCY M.L., TIPPLE T.E., NELIN L.D., ROGERS L.K. (2012) - Lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse transformed Clara cells. *Cell Physiol. Biochem.*, **29**: 213-22.
- BRUN-BUISSON C. (1995) - Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. *J. Am. Med. Assoc.*, **274**: 968-74.
- BUÉNO L., FARGEAS M.J., FIORAMONTI J., PRIMI M.P. (1985) - Central control of intestinal motility by prostaglandins: a mediator of the action of several peptides in rats and dogs. *Gastroenterology*, **88**: 1888-94.
- BUÉNO L., FIORAMONTI J., RUCKEBUSCH Y. (1975) - Rate of flow of digesta and electrical activity of the small intestine in dogs and sheep. *J. Physiol.*, **249**: 69-85.
- BUÉNO L., RUCKEBUSCH Y. (1978b) - Effect of anticholinergic drugs on the electrical activity of the antrum and duodenum-jejunum in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* **1**: 225-232.
- BUÉNO L., RUCKEBUSCH Y. (1978a) - Migrating myoelectrical complexes: disruption, enhancement and disorganisation. En: *Gastrointestinal Motility in Health and Diseases*. Dutie, H. Ed Lancaster, MTP Press. pp: 83-91.
- BUÉNO, L., SORRAING, J.M., FIORAMONTI, J. (1983) - Influence of dopamine on rumino-reticular motility and rumination in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **6**: 93-98.
- BURAKOFF R., PERCY W.H. (1992) - Studies *in vivo* and *in vitro* on effects of PGE<sub>2</sub> on colonic motility in rabbits. *Am. J. Physiol.*, **262**: 23-29.

- CALLEJAS N.A., CASADO M., DÍAZ-GUERRA M.J.M., BOSCA L., MARTÍN-SANZ P. (2001) - Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology*, **33**: 860-7.
- CAO C., MATSUMURA K., YAMAGATA K., WATANABE Y. (1995) - Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. *Brain. Res.*, **697**: 187-96.
- CAO C., MATSUMURA K., YAMAGATA K., WATANABE Y. (1997) - Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *Am. J. Physiol.*, **272**: R1712-25.
- CARRASCO L., CHACÓN-M. DE LARA F., GÓMEZ-VILLAMANDOS J. C., BAUTISTA M. J., VILLEDA C. J., WILKINSON P. J., SIERRA M. A. (1996a) - The pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages in acute African-swine fever. *Research in Veterinary Science*, **61**: 193-198.
- CARRASCO L., GÓMEZ-VILLAMANDOS J. C., BAUTISTA M. J., HERVÁS J., SIERRA M. A. (1996b) - Pulmonary intravascular macrophages in deer. *Veterinary Research*, **27**: 71-77.
- CARRASCO L., NÚÑEZ A., SÁNCHEZ-CORDÓN P. J., PEDRERA M., FERNÁNDEZ DE MARCO M., SALGUERO F. J., GÓMEZ-VILLAMANDOS J. C. (2004) - Immunohistochemical detection of the expression of pro-inflammatory cytokines by ovine pulmonary macrophages. *J. Comp. Path. Vol.*, **131**: 285-293.
- CASADO M., CALLEJAS N.A., RODRIGO J., ZHAO X., DEY S.K., BOSCA L., MARTÍN-SANZ P. (2001) - Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy. *FASEB J.*, **15**: 2016-18.
- CASTRO LÓPEZ M. (2010) - Papel de la sintasa del óxido nítrico (NOS) y de la ciclooxigenasa (COX) en las alteraciones motoras gastrointestinales y la fiebre inducidas por endotoxinas bacterianas en la oveja. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- CERVELLO M., MONTALTO G. (2006) - Cyclooxygenase in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, **12**: 5113-21.
- CHABY R. (1999) - Strategies for the control of LPS-mediated pathophysiological disorders. *Drug Discovery Today*, **4**: 209-221.
- CHUANG YC., YOSHIMURA N., HUANG CC., WU M., CHIANG PH., CHANCELLOR MB. (2009) - Intravesical botulinum toxin A administration inhibits COX-2 and EP<sub>4</sub> expression and suppresses bladder hyperactivity in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Eur. Urol.*, **56**: 159-66.
- CHUNG S.A., ROTSTEIN O., GREENBERG G.R., DIAMANT N.E. (1994) - Mechanisms coordinating gastric and small intestinal MMC: role of extrinsic innervation rather than motilin. *Am. J. Physiol.*, **267**: G800-9.
- CHUNG-REN L., FUMIMASA A., LEE B., HAIBIN W., JUNJI T., TAREK AS. Y CLIFFORD JW. (2006) - Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>4</sub> contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**: 1096-103.
- CODE C.F., MARLETT J.A. (1975) - The interdigestive myo-electric complex of the stomach and small bowel of dogs. *J. Physiol.*, **246**: 289-309.
- COHEN J. (2002) - The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, **420**: 19-26.
- COMINELLI F. (1993) - Cytokines. Immunopharmacology of the Gastrointestinal System. pp: 123-132.



- COOPER A.L., ROTHWELL N.J. (1991) - Mechanisms of early and late hypermetabolism and fever after localized tissue injury in rats. *Am. J. Physiol.*, **261**: E698-705.
- CRAIG R., MEGERMAN J. (1977) - Assembly of smooth muscle myosin into side-polar filaments. *J. Cell. Biol.*, **75**: 990-6.
- CRAVIN P.A., De RUBERTIS F.R. (1983) - Patterns of prostaglandin synthesis and degradation in isolated superficial and proliferative colonic epithelial cells compared to residual colon. *Prostaglandins*, **26**: 583-601.
- CULLEN J.J., CAROPRESSO D.K., EPHGRAVE K.S., HEMANN L.L., HINKHOUSE M.M. (1997) - The effect of endotoxin on canine jejunal motility and transit. *J. Surg. Res.*, **67**: 54-7.
- DE SAEDELEER V., WECHSUNG E., HOUVENAGHEL A. (1991) - Endotoxin in the conscious piglet: Its effects on some general and gastrointestinal myoelectrical parameters. *Vet. Res. Commun.*, **15**: 227-38.
- DE SAEDELEER V., WECHSUNG E., HOUVENAGHEL A. (1992) - Effect of infusion of a diarrheogenic dose of PGE<sub>2</sub> on gastrointestinal electrical activity in the conscious piglet. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **45**: 67-70.
- DE VOS W.C. (1993) - Migrating spike complex in the small intestine of the fasting cat. *Am. J. Physiol.*, **265**: G619-27.
- DECAMP M., WARNER A., MOLINA R., BRAIN J. (1992) - Hepatic versus pulmonary uptake of particles injected into the portal circulation in sheep. Endotoxin escapes hepatic clearance causing pulmonary inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **146**: 224-231.
- DEININGER M.H., BEKURE-NEMARIAM K., TRAUTMANN K., MORGALLA M., MEYERMANN R., SCHLUESENER H.J. (2003) - Cyclooxygenase-1 and -2 in brains of patients who died with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, **20**: 25-30.
- DEKKERS J.A., AKKERMANS L.M., KROESE A.B. (1997) - Effects of the inflammatory mediator prostaglandin E<sub>2</sub> on myenteric neurons in guinea pig ileum. *Am. J. Physiol.*, **272**: 1451-6.
- DELONG P., O'SULLIVAN M.G., HUGGINS E., HUBBARD C.L., McCALL C. (1999) - Bacterial lipopolysaccharide induction of the prostaglandin G/H synthase 2 causes thromboxane-dependent pulmonary hypertension in rabbits. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **20**: 493-99.
- DERIJK R.H., STRIJBOS P.J., VAN ROOIJEN N., ROTHWELL N.J., BERKENBOSCH F. (1993) - Fever and thermogenesis in response to bacterial endotoxins involve macrophage-dependent mechanisms in rats. *Am. J. Physiol.*, **265**: 1179-83.
- DEY I., LEJEUNE M., CHADEE K. (2006) - Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br. J. Pharmacol.*, **149**: 611-23.
- DÍAZ-MUÑOZ M.D., OSMA-GARCÍA I.C., FRESNO M., ÍÑIGUEZ M.A. (2012) - Involvement of PGE<sub>2</sub> and cyclic AMP signaling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. *Biochem. J. Immediate Publication* (manuscript BJ20111052).
- DIJKSTRA C.D., DAMOISEAUX J.G.M.C. (1993) - Macrophage heterogeneity established by immunocytochemistry. *Prog. Histochem. Cytochem.*, **27**: 1-65.

- DIMITRIADOU V., LAMBRACHT-HALL M., REICHLER J., THEOHARIDES T.C. (1990) - Histochemical and ultrastructural characteristics of rat brain perivascular mast cells stimulated with compound 48/80 and carbachol. *Neuroscience*, **39**: 209-24.
- DING M., KINOSHITA Y., KISHI K., NAKATA H., HASSAN S., KAWANAMI C., SUGIMOTO Y., KATSUYAMA M., NEGISHI M., NARUMIYA S., ICHIKAWA A., CHIBA T. (1997) - Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. *Prostaglandins*, **53**: 199-216.
- DOGAN M.D., ATAOGU H., AKARSU E.S. (2002) - Effects of selective cyclooxygenase enzyme inhibitors on lipopolysaccharide-induced dual thermoregulatory changes in rats. *Brain. Res. Bull.*, **57**: 179-85.
- DONG J., QIU S., XIE X.H., PAN R., TANG H.M., LU D.X. (2007) - Effect of daqingye on EP3 mRNA expression of hypothalamus in IL-1 $\beta$ -induced rabbits. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, **23**: 42-5.
- DONG YL., Y YALLAMPALLI C. (2000) - Pregnancy and Exogenous Steroid Treatments Modulate the Expression of Relaxant EP<sub>2</sub> and Contractile FP Receptors in the Rat Uterus. *Biology of Reproduction*, **62**: 533-539.
- DRAY A., BEVAN S. (1993) - Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *TIPS. Trends. Pharmacol. Sci.*, **14**: 287-90.
- DURANTON A., BUÉNO L. (1984) - Central opiate mechanism involved in gastrointestinal motor disturbances induced by *E. coli* endotoxin in sheep. *Life Sci.*, **34**: 1795-9.
- EBERHART C.E., COFFEY R.J., RADHIKA A., GIARDIELLO F.M., FERRENBACH S., DUBOIS R.N. (1994) - Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, **107**: 1183-88.
- EK M., ARIAS C., SAWCHENKO P., ERICSSON-DAHLSTRAND A. (2000) - Distribution of the EP<sub>3</sub> prostaglandin E(2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. *J. Comp. Neurol.*, **428**: 5-20.
- EK M., ENGBLOM D., SAHA S., BLOMQVIST A., JAKOBSSON P.J., ERICSSON-DAHLSTRAND A. (2001) - Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature*, **410**: 430-1.
- ELLIS, E.F., WEI, E.P., KONTOS, H.A. (1979) - Vasodilation of cat cerebral arterioles by prostaglandins D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, G<sub>2</sub>, and I<sub>2</sub>. *Am. J. Physiol.*, **237**: 381-5.
- ELMQUIST J. K., BREDER C. D., SHERIN J. E., SCAMMELL T. E., HICKEY W. F., DEWITT D., SAPER C. B. (1997) - Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *The Journal of Comparative Neurology*, **381**: 119-129.
- ENGBLOM D., SAHA S., ENGSTROM L., WESTMAN M., AUDOLY L.P., JAKOBSSON P.J., BLOMQVIST A. (2003) - Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat. Neurosci.*, **6**: 1137-1138.
- ERMERT L., ERMERT M., GOPPELT-STRUEBE M. (1998) - Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **18**: 479-88.
- ERMERT L., ERMERT M., MERKLE M., GOPPELT-STRUEBE M., DUNCKER H.R., GRIMMINGER F., SEEGER W. (2000) - Rat pulmonary cyclooxygenase-2 expression in response to endotoxina challenge differential regulation in the various types of cells in the lung. *Am. J. Pathol.*, **156**: 1275-87..

- ESKANDARI M.K., KALFF J.C., BILLIAR T.R., LEE K.K., BAUER A.J. (1999) - LPS-induced muscularis macrophage nitric oxide suppresses rat jejunal circular muscle activity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **277**: 478-86.
- FABRIEK B. O., VAN HAASTERT E.S., GALEA I., POLFLIET M. M., DOPP E.D., VAN DEN HEUVEL M. M., VAN DEN BERG T. K., DE GROOT C. J., VAN DER VALK P., DIJKSTRA C. D. (2005) - CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS Express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia*, **51**: 297-305.
- FAIRBROTHER S.E., SMITH J.E., BORMAN R.A., COX H.M. (2011) - Characterization of the EP receptor types that mediate longitudinal smooth muscle contraction of human colon, mouse colon and mouse ileum. *Neurogastroenterol. Motil.*, **23**: 782-336.
- FENG L., SUN W., XIA Y., TANG W. W., CHANMUGAM P., SOYOOOLA E., WILSON C. B., HWANG D. (1993) - Cloning two isoforms of rat cyclooxygenases: Differential regulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**: 361-368.
- FERRERAS-ESTRADA M.C., CAMPO R., GONZÁLEZ.LANZA C., PÉREZ V., GARCÍA-MARÍN J.F., MANGA-GONZÁLEZ M.Y. (2007) - Immunohistochemical study of the local immune response in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea). *Parasitol. Res.*, **101**:547-555.
- FERRIS C.F., GEORGE J.K., ALBERS H.E. (1986) - Circadian rhythm of neurotensin levels in rat small intestine. *Regulatory Peptides*, **15**: 285-92.
- FIORAMONTI J., BUÉNO L., DU C. (1984) - Alterations of digestive motility by *Escherichia coli* endotoxin in rabbits mediated through central opiate receptors. En: *Gastrointestinal Motility*. Roman, C. Ed Lancaster. MTP Press. pp: 549-56.
- FLICKER P.F., WALLIMAN T., VIBERT P. (1983) - Electron microscopy of scallop myosin. Location of regulatory light chains. *J. Mol. Biol.*, **169**: 723-41.
- FONT-NIEVES M., SANS- FONS M.G., GORINA R., BONFILL-TEIXIDOR E., SALAS-PERDOMO A., MÁRQUEZ-KISINOUKY L., SANTALUCÍA T., PLANAS A.M. (2012) - Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E-2 production in astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **287**: 6454-68.
- FORREST A.S., HENNIG G.W., JOKELA-WILLIS S., PARK C.D., SANDERS K.M. (2009) - Prostaglandin regulation of gastric slow waves and peristalsis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **296**: 1180-90.
- FÖRSTERMANN U., HELDT R., HERTTING G., (1983) - Effects of intracerebroventricular administration of prostaglandin D2 on behaviour, blood pressure and body temperature as compared to prostaglandins E2 and F2 alpha. *Psychopharmacology (Berl)*, **80**: 365-370.
- FOX E., THOMAS S.P., BROITMAN S.A. (1990) - Hepatic mechanisms for clearance and detoxification of bacterial endotoxins. *J Nutr Biochem.*, **1**: 620-28.
- FRANTZIDES C.T., LIANOS E.A., WITTMANN D., GREENWOOD B, EDMISTON C.E. (1992) - Prostaglandins and modulation of small bowel myoelectric activity. *Am. J. Physiol.*, **262**: 488-97.
- FUJINO K. (2003) - Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J. Physiol.*, **550**, 227-40.

- FUKUNAGA Y., MINE Y., YOSHINAGA S., TAKEUCHI T., HARA F., YAGASAKI O. (1993) - Role of prostacyclin in acetylcholine release from myenteric plexus of guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*; **233**: 237-42.
- FURUYASHIKI T., NARUMIYA S. (2009) - Roles of prostaglandin E receptors in stress responses. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **9**: 31-8.
- FURUYASHIKI T., NARUMIYA S. (2011) - Stress responses: the contribution of prostaglandin E(2) and its receptors. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **7**: 163-75.
- GARCÍA-BUENO B., SERRATS J., SAWCHENKO P.E. (2009) - Cerebrovascular cyclooxygenase-1 expression, regulation, and role in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by inflammatory stimuli. *The Journal of Neuroscience*, **29**: 12970-81.
- GIANNITRAPANI L., INGRAO S., SORESI M., FLORENA A.M., LA SPADA E., SANDONATO L., D'ALESSANDRO N., CERVELLO M., MONTALTO G. (2009) - Cyclooxygenase-2 expression in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1155**: 293-99.
- GOLLMAN H.M., RUDY T.A. (1988) - Comparative pyrogenic potency of endogenous prostanoids and of prostanoid-mimetics injected into the anterior hypothalamic/preoptic region of the cat. *Brain Res.*, **449**: 281-93.
- GOULD S.R., BRASB A.R., CONNOLLY M.E. (1977) - Increased prostaglandin production in ulcerative colitis. (Abstract). *Lancet*, **2**: 98.
- GRAEBER M.B., STREIT W.J., KREUTZBERG G.W. (1989) - Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J. Neurosci. Res.*, **22**: 103-6.
- GRASA L., ARRUEBO M.P., PLAZA M.A., MURILLO M.D. (2006) - PGE(2) receptors and their intracellular mechanisms in rabbit small intestine. *Prostaglandins and Other Lipid Mediat.*, **79**: 206-17.
- GRAUPERA M., GARCÍA-PAGÁN J.C., ABRALDES J.G., PERALTE C., BRAGULAT M., COROMINOLA H. (2003) - Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology*, **37**: 172-81.
- GRAUPERA M., MARCH S., ENGEL P., RODÉS J., BOSCH J., GARCÍA-PAGÁN J.C. (2005) - Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **288**: 763-70.
- GREENOUGH W.B., PIERCE N.F., AL-AWQATI Q., CARPENTER C.C.J. (1969) - Stimulation of gut electrolyte secretion by prostaglandins, theophylline and cholera exotoxin. (Abstr.) *J. clin. Invest.*, **48**: 32-33.
- GRIGSBY P.L., SOORANNA S.R., ADU-AMANKWA B., PITZER B., BROCKMAN D.E., JOHNSON M.R., MYATT L. (2006) - Regional expression of prostaglandin E2 and F2 receptors in human myometrium, amnion and choriondecidua with advancing gestation and labor. *Biol. Reprod.*, **75**: 297-305.
- GUAN Y., ZHANG Y., BREYER R.M., FOWLER B., DAVIS L., HEBERT R.L., BREYER M.D. (1998) - Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits renal collecting duct Na<sup>+</sup> absorption by activating the EP<sub>1</sub> receptor. *J. Clin. Invest.*, **102**: 194-201.
- GUERRERO-LINDNER E. (2002) - Estudio de la participación del TNF- $\alpha$  y las prostaglandinas en las alteraciones motoras digestivas producidas por endotoxinas en la oveja. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- GUERRERO-LINDNER E., CASTRO M., MUÑOZ J.M., ARRUEBO M.P., MURILLO M.D., BUÉNO L., PLAZA M.A. (2003) - Central tumour necrosis factor- $\alpha$  mediates

- the early gastrointestinal motor disturbances induced by lipopolysaccharide in sheep. *Neurogastroenterol. Motil.*; **15**: 307-16.
- GUYTON A. C., HALL J. E. (2001) - Tratado de Fisiología Médica. 10ª ed.
- HABEL R.E. (1956) - A study of the innervation of the ruminant stomach. *Cornell Vet.*, **46**: 555-633.
- HABIB A., CREMINON C., FROBERT Y., GRASSI J., PRADELLES P., MACLOUF J. (1993) - Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxy-terminal region of the cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **268**: 23448-23454.
- HAGA N., MIZUMOTO A., STO H. M., MOCHIKI E., MIZUSAWA F., OHSHIMA K., ITOH Z. (1996) - Role of endogenous 5-hydroxytryptamine in the regulation of gastric contractions by motilin in dogs. *Am. J. Physiol.*, **270**: G20-8.
- HALL K.E., GREENBERG G.R., EL-SHARKAWY T.Y., DIAMANT N.E. (1983) - Vagal control of migrating motor complex related peaks in canine plasma motilin, pancreatic polypeptide and gastrin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **61**: 1289-98.
- HANISCH U. (2002) - Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, **40**: 140-55.
- HANISCH U., KETTENMANN H. (2007) - Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.*, **10**: 1387-94.
- HASEGAWA, H., NEGISHI M., ICHIKAWA A. (1996) - Two isoforms of the prostaglandin E receptor EP3 subtype different in agonist independent constitutive activity. *J. Biol. Chem.*, **271**: 1857-1860.
- HASSAN S., KINOSHITA Y., MIN D., NAKATA H., KISHI K., MATSUSHIMA Y., ASAHARA M., WANG HY., OKADA A., MAEKAWA T., MATSUI H., CHIBA T. (1996) - Presence of prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor gene expression in a rat gastric mucosal cell line. *Digestion*, **57**: 196-200.
- HEMPEL S. L., MONICK M. M., HUNNINGHAKE G. W. (1994) - Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J. Clin. Invest.* **93**: 391-396.
- HODGES R.J., JENKINS R.G., WHEELER-JONES C.P., COPEMAN D.M., BOTTOMS S.E., BELLINGAN G.J., NANTHAKUMAR C.B., LAURENT G.J., HART S.L., FOSTER M.L., McANULTY R.J. (2004) - Severity of lung injury in cyclooxygenase-2-deficient mice is dependent on reduced prostaglandin E<sub>2</sub> production. *Am. J. Pathol.*, **165**: 1663-76.
- HOFFMAN W.E., SCHMID P.G. (1979) - Cardiovascular and anti-diuretic effects of central prostaglandin-E<sub>2</sub>. *Journal of Physiology*, **288**: 159-69.
- HOLLINGSWORTH M., ISHERWOOD C.N. (1978) - Mechanical responses of the isolated cervix and uterine horn of pregnant rats near term to drugs. *Br. J. Pharmacol.*, **63**: 513-18.
- HOLMES S.W., HORTON E.W., MAIN H.M. (1963) - The effect of prostaglandin E, on responses of smooth muscle to catecholamines, angiotensin and vasopressin. *Brit. J. Pharmacol.*, **21**: 538-543
- HORI M., KITA M., TORIHASHI S., MIYAMOTO S., WON K.J., SATO K., OZAKI H., KARAKI H. (2001) - Upregulation of iNOS by COX-2 in muscular resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **280**: 930-38.

- HOROWITZ B., WARD S.M., SANDERS K.M. (1999) - Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu. Rev. Physiol.*, **61**: 19-43.
- HOSOI M., OKA T., ABE M., HORI T., YAMAMOTO H., MINE K., KUBO C. (1999) - Prostaglandin E(2) has antinociceptive effect through EP(1) receptor in the ventromedial hypothalamus in rats. *Pain*, **83**: 221-27.
- HOUCHEW C.W., STURMOSKI M.A., ANANT S., BREYER R.M. STENSON W.F. (2003) - Prosurvival and antiapoptotic effects of PGE<sub>2</sub> in radiation injury are mediated by EP<sub>2</sub> receptor in intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **284**: 490-8.
- HUIZINGA J.D., THUNEBERG L., KLUPPEL M., MALYSZ J., MIKKELSEN H.B., BERNSTEIN A. (1995) - W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*, **373**: 347-9.
- IKEBE M., HARTSHORNE D.J., ELZINGA M. (1987) - Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activate, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **262**: 9569-73.
- IKEGAMI R., SUGIMOTO Y., SEGI E., KATSUYAMA M., KARAHASHI H., AMANO F., MARUYAMA T., YAMANE H., TSUCHIYA S., ICHIKAWA A. (2001) - The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **166**: 4689-96.
- IVANOV A.I., PERO R.S., SCHECK A.C., ROMANOVSKY A.A. (2002) - Prostaglandin E(2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **283**: R1104-1117.
- IVANOV A.I., ROMANOVSKY A.A. (2004) - Prostaglandin E<sub>2</sub> as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front. Biosci.*, **9**: 1977-1993.
- IWAI K, TOKUNAGA F. (2009) - Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep.*, **10**: 706-13.
- JANSSENS J., HELLEMANS J., ADRIAN T.E., BLOOM S.R., PEETERS T.L., CHRISTOFIDES N., VANTRAPPEN G. (1982) - Pancreatic polypeptide is not involved in the regulation of the migrating motor complex in man. *Regul. Pept.*, **3**: 41-9.
- JEONG S.W., JANG J.Y., LEE S.H., KIM S.G., CHEON Y.K., KIM Y.S., CHO Y.D., KIM H.S., LEE J.S., JIN S.Y., SHIM C.S., KIM B.S. (2010) - Increased expression of cyclooxygenase-2 is associated with the progression to cirrhosis. *Korean J. Intern. Med.*, **25**: 364-71.
- JIANG C., CUI K.F., WANG J.P., HE Y.H. (2011) - Microglia and cyclooxygenase-2: Possible therapeutic targets of progesterone for stroke. *International Immunopharmacology*, **11**: 1925-31.
- JOHNSTON D.E., KROENING C. (1996) - Stimulation of prostaglandin synthesis in cultured liver cells by CCl<sub>4</sub>. *Hepatology*, **24**: 677-84.
- KANDASAMY S.B., WILLIAMS B.A. (1982) - Prostacyclin-induced hyperthermia: implication of a protein mediator. *Neuropharmacology*, **21**: 1065-72.
- KATORI M., MAJIMA M. (2000) - Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm. Res.*, **49**: 367-92.
- KATSUYAMA M., NISHIGAKI N., SUGIMOTO Y., MORIMOTO K., NEGISHI M., NARUMIYA S., ICHIKAWA A. (1995) - The mouse prostaglandin E receptor

- EP<sub>2</sub> subtype: cloning, expression, and Northern blot analysis. *FEBS Letters*, **372**: 151-156.
- KEANE F.B., DIMAGNO E.P., DOZOIS R.R., GO V.L (1980) - Relationships among canine interdigestive exocrine pancreatic and biliary flow, duodenal motor activity, plasma pancreatic polypeptide, and motilin. *Gastroenterology*, **78**: 310-6.
- KIHARA Y., MATSUSHITA T., KITA Y., UEMATSU S., AKIRA S., KIRA J., ISHII S., SHIMIZU T. (2009) - Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE<sub>2</sub> as a therapeutic target for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**: 21807-12.
- KILBOURN R.G., GROSS S.S., JUBRAN A., ADAMS J., GRIFFITH O.W., LEVI R. LODATO R.F. (1990b) - NG-methyl-L-arginine inhibits tumour necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 3629-3632.
- KILBOURN R.G., JUBRAN A., GROSS S.S., GRIFITH O.W., LEVI R., ADAMS J. (1990a) - Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-monomethyl -L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**: 1132-1138.
- KIM W. K., ÁLVAREZ X., FISHER J., BRONFIN B., WESTMORELAND S., MCLAURIN J., WILLIAMS K. (2006) - CD163 identifies perivascular macrophages in normal and viral encephalitic brains and potential precursors to perivascular macrophages in blood. *Am. J. Pathol.*, **168**: 822-34.
- KLIR J.J., ROTH J., SZELÉNYI Z., McCLELLAN J.L., KLUGER M.J. (1993) - Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat. *Am. J. Physiol.*, **265**: R512-7.
- KLUGER M.F. (1991) - Fever: role of endogenous pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.*, **71**: 93-127.
- KMIEC Z. (2001) - Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, **161**:1-151.
- KOMAKI G., ARIMURA A., KOVES K. (1992) - Effect of intravenous injection of IL-1beta on PGE<sub>2</sub> levels in several brain areas as determined by microdialysis. *Am. J. Physiol.*, **262**: 246-51.
- KONGER R.L., BILLINGS S.D., PRALL N.C., KATONA T.M., DASILVA S.C., KENNEDY C.R., BADVE S., PERKINS S.M., LACELLE P.T. (2009) - The EP<sub>1</sub> subtype of the PGE<sub>2</sub> receptor: role in keratinocyte differentiation and expression in non-melanoma skin cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **81**:279–290.
- KONYA V., MARSCHE G., SCHULIGOI R., HEINEMANN A. (2013) - E-type prostanoid receptor 4 (EP<sub>4</sub>) in disease and therapy. *Pharmacol. Ther.*, doi: 10.1016.
- KOPF B.S., LANGHANS W., GEARY N., HRUPKA B., ASARIAN L. (2011) - Evidence that PGE<sub>2</sub> in the dorsal and median raphe nuclei is involved in LPS-induced anorexia in rats. *Pharmacol. Biochemistry and Behaviour*, **99**: 437-43.
- KREUTZBERG, G.W. (1996) - Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.*, **19**: 312-8.
- KUNIKATA T., TANAKA A., MIYAZAWA T., KATO S., TAKEUCHI K. (2002) - 16,16-Dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits indomethacin-induced small intestinal lesions through EP<sub>3</sub> and EP<sub>4</sub> receptors. *Dig Dis Sci.*, **47**: 894-904.



- KUO K.T., WANG H.W., CHOU T.Y., HSU W.H., HSU H.S., LIN C.H., WANG L.S. (2009) - Prognostic role of PGE<sub>2</sub> receptor EP<sub>2</sub> in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, **16**: 352-60.
- LACROIX S., RIVEST S. (1998) - Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *J. Neurochem.*, **70**: 452-66.
- LAWRENCE RA., JONES RL., WILSON NH. (1992) - Characterization of receptors involved in the direct and indirect actions of prostaglandins E and I on the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol.*, **105**: 271-8.
- LAZARUS M., YOSHIDA K., COPPARI R., BASS C.E., MOCHIZUKI T., LOWELL B.B., SAPER C.B. (2007) - EP<sub>3</sub> prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat. Neurosci.*, **10**: 1131-1133.
- LE BRUN A.P., CLIFTON L.A., HALBERT C.E., LIN B., MERON M., HOLDEN P.J., LAKEY J.H., HOLT S.A. (2013) - Structural characterization of a model gram-negative bacterial surface using lipopolysaccharides from rough strains of *Escherichia coli*. *Biomacromolecules*, **14**: 2014-22.
- LEE K., CHEY W., TAI H.H., YAJIMA H. (1978) - Radioimmunoassay of motilin. Validation and Studies on the relationship between plasma motilin and interdigestive myoelectric activity of the duodenum of dog. *Am. J. Dig. Dis.*, **23**: 789-795.
- LEEK B.F., VAN MIERT A.S. (1971) - An analysis of the pyrogen-induced inhibition of gastric motility in sheep. *J. Physiol.*, **215**: 28P-29P.
- LEJEUNE M., LEUNG P., BECK P.L., CHADEE K. (2010) - Role of EP<sub>4</sub> receptor and prostaglandin transporter in prostaglandin E<sub>2</sub>-induced alteration in colonic epithelial barrier integrity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **299**: 1097-105.
- LEKSELL L.G. (1976) - Influence of prostaglandin-E<sub>1</sub> on cerebral mechanisms involved in control of fluid balance. *Acta Physiologica Scandinavica*, **98**: 85-93.
- LI S., BALLOU L.R., MORHAM S.G., BLATTEIS C.M. (2001) - Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1 $\beta$ . *Brain. Res.*, **910**: 163-73.
- LI S., WANG Y., MATSUMURA K., BALLOU L. R., MORHAM S. G., BLATTEIS C. M. (1999) - The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2 (-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain. Res.*, **825**: 86-94.
- LI Z., BLATTEIS C.M. (2004) - Fever onset is linked to the appearance of lipopolysaccharide in the liver. *J. Endotoxin Res.*, **10**: 1-15.
- LI Z., FELEDER C., BLATTEIS C.M. (2004) - Lipopolysaccharide challenge causes exaggerated fever and increased hepatic lipopolysaccharide uptake in vinblastine-induced leukopenic guinea pigs. *Crit. Care Med.*, **32**: 2131-34.
- LI Z., PERLIK V., FELEDER C., TANG Y., BLATTEIS C.M. (2006) - Kupffer cell-generated PGE<sub>2</sub> triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *Am. J. Physiol.*, **290**: R1262-70.
- LIANG Y.C., LIU H.J., CHEN S.H., CHEN C.C., CHOU L.S., TSAI L.H. (2005) - Effect of lipopolysaccharide on diarrhea and gastrointestinal transit in mice: roles of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub>. *World J. Gastroenterol.*, **11**: 357-61.
- LICLICAN E.L., NGUYEN V., SULLIVAN A.B., GRONERT K. (2010) - Selective activation of the prostaglandin E<sub>2</sub> circuit in chronic injury-induced pathologic angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**: 6311-20.

- LIMURO Y., YAMAMOTO M., KOHNO H., ITAKURA J., FUJII H., MATSUMOTO Y. (1994) - Blockade of liver macrophages by gadolinium chloride reduces lethality in endotoxemic rats-analysis of mechanisms of lethality in endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.*, **55**, 723-728.
- LIN Y.M., SARNA S. K., SHI X.Z. (2012) - Prophylactic and therapeutic benefits of COX-2 inhibitor on motility dysfunction in bowel obstruction: roles of PGE<sub>2</sub> and EP receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **302**: 267-75.
- LONGWORTH K.E., SMITH B.L., STAUB N.C., STEFFEY E.P., SERIKOV V.B. (1996) - Use of detergent to prevent initial response to endotoxin in horses. *Am. J. Vet. Res.*, **57**: 1063-66.
- LONGWORTH K.E., WESTGATE A.M., GRADY M.K., WESTCOTT J.Y., STAUB N.C. (1992) - Development of pulmonary intravascular macrophage function in newborn lambs. *Journal of Applied Physiology*, **73**: 2608-15.
- LUJÁN L., BEGARA I., COLLIE D.D.S., WATT N.J. (1994) - Ovine Lentivirus (Maedi-Visna) protein expression in sheep alveolar macrophages. *J. Vet. Pathol.*, **31**: 695-703.
- MACKOWIAK P.A., BOULANT J.A. (1996) - Fever's glass ceiling. *Clin. Infect. Dis.*, **22**: 525-36.
- MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., PARKER J. (1999) - Biología de los microorganismos. 8ª ed. Ed. Prentice Hall. Madrid. pp: 75-78.
- MAIER A. M., HLA T., MACIAG T. (1990) - Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 10805-10808.
- MANNING B.P., SHARKEY K.A., MAWE G.M. (2002) - Effects of PGE<sub>2</sub> in guinea pig colonic myenteric ganglia. *Am. J. Physiol.*, **283**: 1388-97.
- MANNING D.S., SHEEHAN K.M., BYRNE M.F., KAY E.W., MURRAY F.E. (2007) - Cyclooxygenase-2 expression in chronic hepatitis C and the effect of interferon alpha treatment. *J. Gastroenterol. and Hepatol.*, **22**: 1633-37.
- MARÍN-TEVA J.L., CUADROS M.A., MARTÍN-OLIVA D., NAVASCUES J. (2012) - Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol.*, **1**:1-16.
- MARTÍN-SANZ P., CALLEJAS N.A., CASADO M., DÍAZ-GUERRA M.J., BOSCA L. (1998) - Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines. *Br. J. Pharmacol.*, **125**: 1313-19.
- MATSUMURA K., CAO C., OZAKI M., MORII H., NAKADATE K., WATNABE Y. (1998) - Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. Neurosci.*, **18**:6279-89.
- MATSUMURA K., WATANABE Y., ONOE H., HAYAISHI O. (1990) - High density of prostaglandin-E<sub>2</sub> binding sites in the anterior wall of the 3<sup>rd</sup> ventricle. A possible site of its hyperthermic action. *Brain Res.*, **533**: 147-51.
- MATSUO, M., HAMASAKI, Y., FUJIYAMA, F., MIYAZAKI, S. (1995) - Eicosanoids are produced by microglia, not by astrocytes, in rat glial cell cultures. *Brain Res.*, **685**: 201-4.
- MATSUOKA Y., FURUYASHIKI T., YAMADA K., NAGAI T., BITO H., TANAKA Y., KIOTA S., USHIKUBI F., NABESHIMA T., NARUMIYA S. (2005) - Prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> controls impulsive behaviour under stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 16066-71.

- McCANN M.E., RICKES E.L., HORA D.F., CUNNINGHAM P.K., ZHANG D., BRIDEAU, C., BLACK W.C., HICKEY G.J. (2005) - *In vitro* effects and *in vivo* efficacy of a novel cyclooxygenase-2 inhibitor in cats with lipopolysaccharide-induced pyrexia. *Am. J. Vet. Res.*, **66**: 1278-84.
- MERCIER F., KITASAKO J.T., HATTON G.I. (2003) - Fractones and other basal laminae in the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, **455**: 324-40.
- MINGHETTI L., WALSH D.T., LEVI G., PERRY V.H. (1999) - In vivo expression of cyclooxygenase-2 in rat brain following intraparenchymal injection of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines. *Journal of Neuropathol. and experimental Neurol.*, **58**: 1184-91.
- MINGHETTI, L. (2004) - Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **63**: 901–910.
- MINGHETTI, L., LEVI, G. (1998) - Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.*, **54**: 99–125.
- MION F., JASUJA R., JOHNSTON D.E. (1995) - The contribution of hepatocytes to prostaglandin synthesis in rat liver. *Prostaglandin Leukot. Essent Fatty Acids*, **53**: 109-15.
- MITCHELL J.A., BELVISI M.G., AKARASEREENONT P. (1994) - Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 1008-14.
- MIYAKE K. (2007) - Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin. Immunol.*, **19**: 3-10.
- MIZGERD J.P., MOLINA R.M., STEAMS R.C., BRAIN J.D., WARNER A.E. (1996) - Gadolinium induces macrophage apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, **59**: 189-95.
- MOHAMMED N.A., EL-HAFIZ H.A., McMAHON R.F.T. (2004) - Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrosis. *J. Clin. Pathol.*, **57**: 350-54.
- MOLINA R.M., WARNER A.E., BRAIN J.D. (1995) - Uptake of circulating particles by sheep pulmonary intravascular macrophages (PIMs) is significantly decreased by intravenous gadolinium chloride. *FASEB J.*, **9**: 570.
- MORIMOTO A. MURAKAMI N. NAKAMORI T., WATANABE T. (1988b) - Multiple control of fever production in the central nervous system of rabbits. *J. Physiol.*, **397**: 269-280.
- MORIMOTO A., MURAKAMI N., NAKAMORI T., WATANABE T. (1988a) - Ventromedial hypothalamus is highly sensitive to prostaglandin E<sub>2</sub> for producing fever in rabbits. *J. Physiol.*, **397**: 259-268.
- MORIMOTO K., SUGIMOTO Y., KATSUYAMA M., OIDA H., TSUBOI K., KISHI K., KINOSHITA Y., NEGISHI M., CHIBA T., NARUMIYA S., ICHIKAWA A. (1997) - Cellular localization of mRNAs for prostaglandin E receptor subtypes in mouse gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.*, **272**: 681-7.
- MORIMOTO, A., MURAKAMI, N., NAKAMORI, T., WATANABE, T. (1987).- Evidence for separate mechanisms of induction of biphasic fever inside and outside the blood-brain barrier in rabbits. *J. Physiol.*, **383**: 629-37.

- MORSY M.A., ISOHAMA Y., MIYATA T. (2001) - Prostaglandin E<sub>2</sub> increases surfactant secretion via the EP<sub>1</sub> receptor in rat alveolar type II cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **426**: 21-24.
- MUELLER L.R., DUKE G.E., EVANSON O.A. (1990) - Investigation of the migrating motor complex in domestic turkeys. *Am. J. Physiol.*, **259**: 329-33.
- MUKHOPADHYAY A. K., THOR P.J., COPELAND E.M., JOHNSON L.R., WEISBRODT N.W. (1977) - Effect of cholecystokinin on myoelectric activity of small bowel of the dog. *Am. J. Physiol.*, **232**: 44-47.
- MULHOLLAND MW., SIMEONE DM. (1993) - Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulation of acetylcholine release from guinea pig myenteric plexus neurons. *Am. J. Surg.*, **166**: 552-6.
- MWANGI D.M., HOPKINS J., LUCKINS A.G. (2007) - Cellular phenotypes in *Trypanosoma congolense* infected sheep: the local skin reaction. *Parasite Immunology*, **12**: 647-658.
- NAGAKURA Y., ITO H., KAMATO T., NISHIDA A., MIYATA K. (1997) - Effect of a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist on gastric motility in fasted and fed dogs. *Eur. J. Pharmacol.*, **327**: 189-93.
- NAKAMURA K., KANEKO T., YAMASHITA Y., HASEGAWA H., KATOH H., ICHIKAWA A., NEGISHI M. (1999) - Immunocytochemical localization of prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor in the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, **260**: 117-20.
- NAKAMURA K., KANEKO T., YAMASHITA Y., HASEGAWA H., KATOH H., NEGISHI M., (2000) - Immunohistochemical localization of prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor in the rat nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **421**: 543-569.
- NAKAMURA Y., NAKAMURA K., MORRISON S.F. (2009) - Different populations of prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor-expressing preoptic neurons project to two fever-mediating sympathoexcitatory brain regions. *Neuroscience*, **161**: 614-20.
- NAMBA T., SUGIMOTO Y., NEGISHI M., IRIE A., USHIKUBI F., KAKIZUKA A., ITO S., ICHIKAWA A., NARUMIYA S. (1993) - Alternative splicing of C terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> determines G-protein specificity. *Nature*, **365**: 166-170.
- NARUMIYA S. (2003) - Prostanoids in immunity: roles revealed by mice deficient in their receptors. *Life Sci.*, **74**: 391-95.
- NARUMIYA S., SUGIMOTO Y., USHIKUBI F. (1999) - Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological reviews*, **79**: 1193-226.
- NATARAJ C., THOMAS DW., TILLEY SL., NGUYEN M., MANNON R., KOLLER BH. Y COFFMAN TM. (2001) - Receptors for prostaglandin E<sub>2</sub> that regulate cellular immune responses in the mouse. *J. Clin. Invest.*, **108**: 1229-1235.
- NEGISHI, M., SUGIMOTO Y., IRIE A., NARUMIYA S., ICHIKAWA A. (1993) - Two isoforms of prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, **268**: 9517-9521.
- NEZAMIS J.E., ROBERT A., STOWE D.F. (1971) - Inhibition by prostaglandin E<sub>1</sub> of gastric secretion in the dog. *J. Physiol. (Lond.)*, **218**: 369-383.
- NOREL X., de MONTPREVILLE V., BRINK C. (2004) - Vasoconstriction induced by activation of EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub> receptors in human lung: effects of ONO-AE-248, ONO-DI-004, ONO-8711 or ONO-8713. *Prostaglandins and other Lipid Mediat.*, **74**: 101-12.

- NOREL X., WWALCH L., LABAT C., GASCARD J.P., DULMET E., BRINK C. (1999) - Prostanoid receptors involved in the relaxation of human bronchial preparations. *Br. J. Pharmacol.*, **126**: 867-72.
- NORTHEY A., DENIS D., CIRINO M., METTERS K.M., NANTEL F. (2000) - Cellular distribution of prostanoid EP receptors mRNA in the rat gastrointestinal tract. *Prostaglandins and other Lipid mediators*, **62**: 145-156.
- NÚÑEZ O., CLEMENTE G., GARCÍA C. (2003) - Papel de la ciclooxigenasa 2 en la patogenia de las enfermedades del hígado. *Med. Clin.*, **121**: 743-8.
- OHINATA K., SUETSUGU K., FUJIWARA Y., YOSHIKAWA M. (2006) - Activation of prostaglandin E receptor EP<sub>4</sub> subtype suppresses food intake in mice. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **81**:31–36.
- OHINATA K., YOSHIKAWA M. (2008) - Central prostaglandins in food intake regulation. *Nutrition*, **24**: 798-801.
- OKA T., HORI T. (1994) - EP<sub>1</sub>-receptor mediation of prostaglandin E<sub>2</sub>-induced hyperthermia in rats. *Am. J. Physiol.*; **267**: 289-94.
- OKA T., OKA K., KOBAYASHI T., SUGIMOTO Y., ICHIKAWA A., USHIKUBI F., NARUMIYA S., SAPER C.B. (2003a) - Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub> receptors. *J. Physiol.*; **15**: 945-54.
- OKA T., OKA K., SAPER C.B. (2003b) - Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats. *Brain. Res.*, **968**: 256-62.
- OKA T., OKA K., SCAMMELL T.E., LEE C., KELLY J.F., NANTEL F., ELMQUIST J.K., SAPER C.B. (2000) - Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *J. Comp Neurol.*, **428**: 20-32.
- OKADA Y., HARA A., MA H., XIAO CY., TAKAHATA O., KOHGO Y., NARUMIYA S., USHIKUBI F. (2000) - Characterization of prostanoid receptors mediating contraction of the gastric fundus and ileum: studies using mice deficient in prostanoid receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **131**: 745-55.
- OKUDA-ASHITAKA, E.,SAKAMOTO K.,EZASHI T.,MIWA K.,ITO S., HAYAISHI O. (1996) - Suppression of prostaglandin E receptor signaling by the variant form of EP<sub>1</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, **271**: 31255–31261.
- OLSEN HULT L.T., KLEIVELAND C.R., FOSNES K., JACOBSEN M., LEA T. (2011) - EP receptor expression in human intestinal epithelium and localization relative to the stem cell zone of the crypts. *PloS ONE*, **6**: e26816.
- PARK G.Y., CHRISTMAN J.W. (2006) - Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung C ell Mol. Physiol.*, **290**: 797-805.
- PARROTT RF., VELLUCCI SV. (1996) - Effects of centrally administered prostaglandin EP receptor agonists on febrile and adrenocortical responses in the prepubertal pig. *Brain Res. Bull.*; **41**: 97-103.
- PEETERS T.L., JANSSENS J., VANTRAPPEN G.R. (1980) - Fasting plasma motilin levels are related to the interdigestive motility complex. *Gastroenterology*, **79**: 716-719.

- PERLIK V., LI Z., GOORHA S., BALLOU L.R., BLATTEIS C.M. (2005) - LPS-activated complement, not LPS per se, triggers the early release of PGE<sub>2</sub> by Kupffer cells. *Am. J. Physiol.*, **289**: R332-39.
- PLAZA M.A., ARRUEBO M.P., MURILLO M.D. (1996a) - Involvement of somatostatin, bombesin and serotonin in the origin of the migrating myoelectric complex in sheep. *Life Sci.*, **58**: 2155-65.
- PLAZA M.A., ARRUEBO M.P., MURILLO M.D. (1996b) - Effect of motilin, somatostatin and bombesin on gastroduodenal myoelectric activity in sheep. *Life Sci.*, **58**: 1413-23.
- PLAZA M.A., ARRUEBO M.P., MURILLO M.D. (1997a) - Evidence for the involvement of 5-HT<sub>4</sub> in the 5-hidroxytryptamine-induced pattern of migrating myoelectric complex in sheep. *Br. J. Pharmacol.*, **120**: 1144-50.
- PLAZA M.A., ARRUEBO M.P., SOPENA J., BONAFONTE J.I., MURILLO M.D., (1996c) - Myoelectrical activity of the gastrointestinal tract of sheep analysed by computer. *Res. Vet. Sci.*, **60**: 55-60.
- PLAZA M.A., FIORAMONTI J., BUÉNO L. (1997b) - Role of central interleukin-1 beta in gastrointestinal motor disturbances induced by lipopolysaccharide in sheep. *Dig. Dis. Sci.*, **42**: 242-50.
- POCOCK J.M., KETTENMANN H. (2007) - Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.*, **30**: 527-35.
- POITRAS P., STEINBACH J.H., VANDEVENTER G., CODE C.F., WALSH J.H. (1980) - Motilin-independent ectopic fronts of the interdigestive myoelectric complex in dogs. *Am. J. Physiol.*, **239**: G215-20.
- POLFLIET M.M.J., FABRIEK B.O., DANIELS W.P., DIJKSTRA C.D., VAN DEN BERG T.K. (2006) - The rat macrophage scavenger receptor CD163: Expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunology*, **211**: 419-425.
- POLL C., GRIX S., COLEMAN R.A. (1988) - Further evidence for the existence of neuronal prostanoid receptors which enhance neurotransmission in the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, **88**: 806P.
- PONGLOWHAPAN S., CHURCH D.B., KHALID M. (2010) - Expression of prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtypes in the canine lower urinary tract varies according to the gonadal status and gender. *Theriogenology*, **74**: 1450-66.
- PONS L., DROY-LEFAIX M.T., BRAQUET P., BUÉNO L. (1989) - Involvement of plaquelet-activating factor (PAF) in endotoxin-induced intestinal motor disturbances in rats. *Life Sci.*, **45**: 533-541.
- PRESCOTT L.M., HARLEY J.P., KLEIN D.A. (1999) - Microbiología. 4ª ed. Ed McGraw-Hill-Interamericana de España S.A. Madrid. pp: 55-58.
- PRINZ M., MILDNER A. (2011) - Microglia in the CNS: Immigrants from another world. *Glia*, **59**: 177-187.
- RACANELLI V., REHERMANN B. (2006) - The liver as an immunological organ. *Hepatology* Vol. 43, No. 2, Suppl. 1.
- RADI Z.A., MEYERHOLZ D.K., ACKERMANN M.R. (2010) - Pulmonary cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 cellular expression and distribution after respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infection. *Viral Immunology*, **23**: 43-8.
- RANDALL D., BURGGREN W., FRENCH K., ECKERT R. (1997) - Animal physiology: mechanisms and adaptations. 4ª ed. Ed WH Freeman and Company. New York. pp: 645.

- RAZ A., WYCHE A., SIEGEL N., NEEDLEMAN P. (1988) - Regulation of fibroblast cyclooxygenase sintesis by interleukin 1. *J. Biol. Chem.*, **263**: 3022-28.
- REBOLLAR E., ARRUEBO M.P., PLAZA M.A., MURILLO M.D. (2002) - Effect of lipopolysaccharide on rabbit small intestine muscle contractility *in vitro*: role of prostaglandins. *Neurogastroenterol. Motil.*, **14**: 633-42.
- RESETA L.S., BARRETT K.E. (2002) - Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX2. *Gastroenterology*, **122**: 1070-87.
- RICHARDSON J.Y., OTTOLINI M.G., PLETNEVA L. (2005) - Respiratory syncytial virus (RSV) infection induces cyclooxygenase 2: a potential target for RSV therapy. *J. Immunol.*, **174**: 4356-64.
- ROBERT A. (1991) - Prostaglandins and the gastrointestinal tract. En: Physiology of the gastrointestinal Tract. Jonson, L.R. Ed Raven Press. New York. pp: 1407-1434.
- ROBERTS E.S., MASLIAH E., FOX H.S. (2004) - CD163 identifies a unique population of ramified microglia in HIV encephalitis (HIVE). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **63**: 1255-64.
- ROMANSKI K.W. (2009) - Mechanisms controlling the gastrointestinal migrating motor complex. *Journal of Pre-Clinical Research* **1**: 11-19.
- ROMANSKI K.W. (2009a) - Migrating motor complex in biological sciences: Characterization, animal models and disturbances. *Indian Journal of Experimental Biology* **47**: 229-244.
- ROTONDO D., ABUL H.T., MILTON A.S., DAVIDSON J. (1988) - Pyrogenic immunomodulators increase the lever of prostaglandin E<sub>2</sub> in the blood simultaneously with the onset of fever. *Eur. J. Pharmacol.*, **154**: 145-52.
- RUCKEBUSCH Y. (1970) - The electrical activity of the digestive tract of the sheep as an indication of the mechanical events in various regions. *J. Physiol.*, **210**: 857-64.
- RUCKEBUSCH Y., BUÉNO L., FIORAMONTI J. (1981) - Techniques d'étude. En: La mécanique digestive chez les mammifères. Ed Masson. Paris. pp: 14.
- RUCKEBUSCH Y., FIORAMONTI J. (1975) - Electrical spiking activity and propulsion in small intestine in fed and fasted rats. *Gastroenterology*, **68**: 1500-8.
- RUCKEBUSCH Y., LAPLACE J.P. (1967) - Intestinal motility in sheep: mechanical and electrical phenomena. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, **161**: 2517-23.
- RUCKEBUSCH Y., PAIRET M. (1984) - Duodenal bulb motor activity in sheep. *Zbl. Vet. Med. A.*, **31**: 401-3.
- RUCKEBUSCH, Y., GRIVEL, M.L., SANTINI, R. (1968) - Technique de dérivation chronique de l'activité électrique et mécanique du tractus digestive chez l'animal éveillé. *Soc. Sci. Vet. Comp. Lyon.*, **70**: 337-365.
- RUUD J., NILSSON A., ENGSTRÖM R.L., WANG W., NILSBERTH C., IRESJÖ B.M., LUNDHOLM K., ENGBLOM D., BLOMQVIST A. (2013) - Cancer-induced anorexia in tumor-bearing mice is dependent on cyclooxygenase-1. *Brain Behav. Immun.*, **29**: 124-35.
- SANDERS K.M., ROSS G. (1978) - Effects of endogenous prostaglandin E on intestinal motility. *Am. J. Physiol.*, **234**: G442-8.
- SAPER C.B. (2010) - The dance of the perivascular and endothelial cells: mechanisms of braon response to immune signaling. *Neuron.*, **65**: 4-6.



- SARNA S.K. (1985) - Cyclic motor activity; migrating motor complex. *Gastroenterology*, **89**: 894-913.
- SCHILTZ, J.C., SAWCHENKO, P.E. (2002) - Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J. Neurosci.*, **22**: 5606–5618.
- SCHMITZ T., LEVINE BA., NATHANIELSZ PW. (2006) - Localization and steroid regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> receptor protein expression in ovine cervix. *Reproduction*, **131**: 743-50.
- SCHNEEBERGER-KEELEY E., BURGER E. (1970) - Intravascular macrophages in cat lungs after open chest ventilation. *Lab. Invest.*, **22**: 361-369.
- SCHWAB J.M., NGUYEN T.D., POSTLER E., MEYERMANN R., SCHLUESENER H.J. (2000a) - Selective accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells/macrophages in lesions of human focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.*, **99**: 609-14.
- SCHWAB, J.M., BESCHORNER, R., MEYERMANN, R., GÖZALAN, F., SCHLUESENER, H.J. (2002) - Persistent accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells and macrophages and transient upregulation by endothelium in human brain injury. *J. Neurosurg.*, **96**: 892-9.
- SCHWAB, J.M., BRECHTEL, K., NGUYEN, T.D., SCHLUESENER, H.J. (2000) - Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. *J. Neuroimmunol.*, **111**: 122-30.
- SCHWARTZ J.I., CHAN C.C., MUKHOPADHYAY S., MCBRIDE K.J., JONES T.M., ADCOCK S., MORITZ C., HEDGES J., GRASING K., DOBRATZ D., COHEN R.A., DAVIDSON M.H., BACHMANN K.A., GERTZ B.J. (1999) - Cyclooxygenase-2 inhibition by rofecoxib reverses naturally occurring fever in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **65**: 653-60.
- SEHIC E, HUNTER W.S., UNGAR A.L., BLATTEIS C.M. (1997) - Blockade of Kupffer cells prevents the febrile and preoptic prostaglandin E<sub>2</sub> responses to intravenous lipopolysaccharide in guinea pigs. *Ann NY Acad Sci.*, **813**: 448-452.
- SEHIC E., LI S., UNGAR A.L., BLATTEIS C.M. (1998) - Complement reduction impairs the febrile response of guinea pigs to endotoxina. *Am. J. Physiol.*, **274**: 1594-603.
- SEIBERT K., ZHANG Y., LEAHY K. (1994) - Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 12013-17.
- SELLERS J.R., HARVEY E.V. (1984) - Localization of a light-chain binding site on smooth muscle myosin revealed by light-chain overlay of sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide electrophoretic gels. *J. Biol. Chem.*, **259**: 14203-7.
- SELLERS J.R., SOBEIRO M.S., FAUST K., BENGUR A.R., HARVEY E.V. (1988) - Preparation and characterization of heavy meromyosin and subfragment 1 from vertebrate cytoplasmic myosins. *Biochemistry*, **27**: 6977-82.
- SENIOR J., MARSHALL K., SANGHA R., BAXTER G.S., CLAYTON J.K. (1991) - In vitro characterization of prostanois EP-receptors in the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 747-53.

- SERIKOV V.B., GLAZANOVA T.V., JEROME E.H., FLEMING N.W., HIGASHIMORI H., STAUB N.C. (2003) - Tyloxapol attenuates the pathologic effects of endotoxin in rabbits and mortality following cecal ligation and puncture in rats by blockade of endotoxin receptor–ligand interactions. *Inflammation*, **27**: 175-190.
- SEYMOUR M.L., GILBY N., BARDIN P.G. (2002) - Rhinovirus infection increases 5.lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in bronchial biopsy specimens from nonatopic subjects. *J. Infect. Dis.*, **185**: 540-44.
- SHAHBAZIAN A., HEINEMANN A., PESKAR B.A., HOLZER P. (2002) - Differential peristaltic motor effects of prostanoid (DP, EP, IP, TP) and leukotriene receptor agonists in the guinea-pig isolated small intestine. *B. J. Pharmacology*, **137**: 1047-54.
- SHAW C., BUCHANAN K.D. (1983) - Intact neurotensin (NT) in human plasma: response to oral feeding. *Regulatory Peptides*, **7**: 145-53.
- SHI J., JOHANSSON J., WOODLING N.S., WANG Q., MONTINE T.J., ANDREASSON K. (2010) - The prostaglandin E2 E-prostanoid 4 receptor exerts anti-inflammatory effects in brain innate immunity. *J Immunol*, **184**: 7207-18.
- SHIMAZU R., AKASHI S., OGATA H., NAGAI Y., FUKUDOME K., MIYAKE K., KIMOTO M. (1999) - MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.*, **189**: 1777-82.
- SHOJI Y., TAKAHASHI M., KITAMURA T., WATANABE K., KAWAMORI T., MARUYAMA T. (2004) - Down regulation of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> during colon cancer development. *Gut*, **53**: 1151-58.
- SIMMONS, D.L., BOTTING, R.M., HLA, T. (2004) - Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.*, **56**: 387-437.
- SIRKO S., BISHAI I., COCEANI F. (1989) - Prostaglandin formation in the hypothalamus in vivo: effect of pyrogens. *Am. J. Physiol.*, **256**: 616–624.
- SISSON S., GROSSMAN J.D., GETTY R. (1998) - Anatomía de los animales domésticos. 5ª ed. Ed Masson S.A. Barcelona. pp: 982-1009.
- SKARNES R.C., BROWN S.K., HULL S.S., MCCracken J.A. (1981) - Role of prostaglandin E2 in the biphasic fever response to endotoxin. *J. Exp. Med.*, **154**: 1212-24.
- SLAWIK H., VOLK B., FIEBICH B., HÜLL M. (2004) - Microglial expression of prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor in excitotoxic lesions in the rat striatum. *Neurochemistry International*, **45**: 653-60.
- SMALL J.V., FÜRST D.O., De MEY J. (1986) - Localization of filamin in smooth muscle. *J. Cell. Biol.*, **102**: 210-20.
- SMID S.D., SVENSSON K.M. (2009) - Inhibition of cyclooxygenase-2 and EP<sub>1</sub> receptor antagonism reduces human colonic longitudinal muscle contractility in vitro. *Prostaglandins and other Lipid Mediat.*, **88**: 117-21.
- SMITH W.L., DeWITT D.L., GARAVITO R.M. (2000) - Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**: 145-82.
- SMITH W.L., GARAVITO R.M., DeWITT D.L. (1996) - Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **271**: 33157-60.
- SOMLYO A.P., SOMLYO A.V. (1994) - Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **372**: 231-6.

- SPLAWINSKI J.A., NIES A.S., BIECK P.R., OATES J.A. (1971) - Mechanism of the contraction induced by arachidonic acid (AA) on the rat stomach longitudinal muscle strip. *Pharmacologist*, **13**: 291.
- STAMME C., BUNDSCHUH D.S., HARTUNG T., GEBERT U., WOLLIN L., NUSING R., WENDEL A., UHLIG S. (1999) - Temporal sequence of pulmonary and systemic inflammatory responses to graded polymicrobial peritonitis in mice. *Infect. Immun.*, **67**: 5642-50.
- STAUB N.C., LONGWORTH K., SERIKOV V.B., JEROME E.H., ELSASSER T. (2001) - Detergent inhibits 70-90% of response to intravenous endotoxin in awake sheep. *J. Appl. Physiol.*, **90**: 1788-97.
- STEAD R.H., TOMIOKA M., QUINONEZ G., SIMON G.I., BELTEN S.Y., BIENENSTOCK J. (1987) - Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 2975-9.
- STEINER A.A., IVANOV A.I., SERRATS J., HOSOKAWA H., PHAYRE A.N., ROBBINS J.R., ROBERTS J.L., KOBAYASHI S., MATSUMURA K., SAWCHENKO P.E., ROMANOVSKY A.A. (2006) - Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS. Biol.*, **4**: 1517-24.
- STEINER A.A., LI S., LLANOS-Q J., BLATTEIS C.M. (2001) - Differential inhibition by nimesulide of the early and late phases of intravenous- and intracerebroventricular-LPS-induced fever in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation*, **9**: 263-75.
- STREIT, W.J. (2002) - Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, **40**: 133-139.
- STROMER M.H. (1995) - Immunocytochemistry of the muscle cell cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.*, **31**: 95-105.
- SUGIMOTO Y., NEGISHI M., HAYASHI Y., NAMBA T., HONDA, A., WATABE A.,HIRATA M.,NARUMIYA S.,ICHIKAWA A. (1993) - Two isoforms of the EP<sub>3</sub> receptor with different carboxyl-terminal domains: identical ligand binding properties and different coupling properties with Gi proteins. *J. Biol. Chem.*, **268**: 2712-2718.
- SUGIMOTO Y., SHIGEMOTO R., NAMBA T., NEGISHI M., MINUZO N., NARUMIYA S., ICHIKAWA A. (1994) - Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> in the mouse nervous system. *Neuroscience*, **62**: 919-28.
- SUZUKI K., ARAKI H., MIZOGUCHI H., FURUKAWA O., TAKEUCHI K. (2001) - Prostaglandin E inhibits indomethacin-induced gastric lesions through EP<sub>1</sub> receptors. *Digestion*, **63**: 92-101.
- SUZUKI S., TANITA T., KUBO H., ASHINO Y., CHIDA M., KOIKE K., FUJIMURA S. (1993) - Stimulation of pulmonary intravascular macrophages increases microvascular permeability in awake sheep. *Tohoku J. Exp. Med.*, **169**: 121-30.
- SWEENEY H.L., YANG Z., ZHI G., STULL J.T., TRIBUS K.M. (1994) - Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 1490-4.
- SZURSZEWSKI J.H. (1969) - A migrating electric complex of the canine small intestine. *Am. J. Physiol.*, **217**: 1757-63.
- TACK J. (2006) - Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in human. *Gut* **55**: 327-33.

- TACK J., PEETERS T. (2001) - What comes after macrolides and other motilin stimulants? *Gut* **49**: 317-18.
- TAJIMA T., MURATA T., ARITAKE K., URADE Y., MICHISHITA M., MATSUOKA T., NARUMIYA S., OZAKI H., HORI M. (2012) - EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptors on muscularis resident macrophages mediate LPS-induced intestinal dysmotility via iNOS upregulation through cAMP/ERK signals. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **302**: 524-534.
- TAKAFUJI V., COSME R., LUBLIN D., LYNCH K., ROCHE J. K. (2000) - Prostanoid receptors in intestinal epithelium: selective expression, function, and change with inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **63**: 223-235.
- TAKAHASHI S., TAKEUCHI K., OKABE S. (1999) - EP<sub>4</sub> receptor mediation of prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol.*; **58**: 1997-2002.
- TAKAHASHI T. (2012) - Mechanism of interdigestive migrating motor complex. *J. Neurol. Mot.* **18**: 246-257.
- TAKAKUWA K. (1982) - Effects of vagotomy on gastrointestinal myoelectric pattern of the conscious dog. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi* **18**:19-38.
- TAKEUCHI K. (2010) - Prostaglandin EP receptors and their roles in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. *Adv. Clin. Chem.*, **51**: 121-44.
- TAKEUCHI K., AIHARA E., SASAKI Y., NOMURA Y., ISE F. (2006) - Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E<sub>2</sub> and EP<sub>1</sub> receptors in acid-induced HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in stomach. *J. Physiol. Pharmacol.*, **57**:661-76.
- TAKEUCHI K., UKAWA H., KATO S., FURUKAWA O., ARAKI H., SUGIMOTO Y., (1999) - Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP<sub>3</sub>. *Gastroenterology*, **117**: 1128-35.
- TANAKA K., FURUYASHIKI T., KITAOKA S., SENZAI Y., IMOTO Y., SEGINISHIDA E., DEGUCHI Y., BREYER R.M., BREYER M.D., NARUMIYA S. (2012) - Prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *J. Neurosci.*, **32**: 4319-29.
- TANI S., OKUDA M., MORISHIGE R., TANAKA T. (1997) - Gastric mucin secretion from cultured rat epithelial cells. *Biol. Pharm. Bull*, **20**: 482-85.
- TAYLOR E.W. (1987) - Comparative studies on the mechanism of regulation of smooth and striated muscle actomyosin. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **245**: 59-66.
- THOR P., KONTUREK J.W., KONTUREK S.J., ANDERSON J.H. (1985) - Role of prostaglandins in control of intestinal motility. *Am. J. Physiol.*, **248**: 353-9.
- TILLEY S.L., HARTNEY J.M., ERIKSON C.J., JANIA C., NGUYEN M., STOCK J., MCNEISCH J., VALANCIUS C., PANETTIERI R.A., PENN R.B. (2003) - Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on airway tone. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **284**: 599-606.
- TORTORA G.J., DERRICKSON B. (2006) - Principios de anatomía y fisiología. 11ª ed. Ed. Panamericana.pp: 925.
- TSUCHIYA H., OKA T., NAKAMURA K., ICHIKAWA A., SAPER C.B. (2008) - Prostaglandin E<sub>2</sub> attenuates preoptic expression of GABA<sub>A</sub> receptors via EP<sub>3</sub> receptors. *J. Biol. Chemistry*, **283**: 11064-71.
- TSUJII H., OKAMOTO Y., KIKUCHI E., MATSUMOTO M., NAKANO H. (1993) - Prostaglandin E<sub>2</sub> and rat liver regeneration. *Gastroenterology*, **105**: 495-9.

- ULEVITCH R.J., TOBIAS P.S. (1995) - Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxina. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**: 437-457.
- USHIKUBI F., SEGI E., SUGIMOTO Y., MURATA T., MATSUOKA T., KOBAYASHI T., HIZAKI H., TUBOI K., KATSUYAMA M., ICHIKAWA A., TANAKA T., YOSHIDA N., NARUMIYA S. (1998) - Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub>. *Nature*, **395**: 281-4.
- VAN MIERT A.S.J.P.A.M. (1990) - Influence of febrile disease on the pharmacokinetics of veterinary drugs. *Ann. Rech. Vet.*, **21**: 11S-28S.
- VAN MIERT A.S.J.P.A.M. (1994) - Pro-inflammatory cytokines in the ruminant. 6th EAVPT Congress. pp: 12-14.
- VAN MIERT A.S.J.P.A.M. y Van DUIN C.T. (1998) - Pharmacological and pathophysiological modulation of food intake and forestomach motility in small ruminants. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **21**: 1-17.
- VAN MIERT A.S.J.P.A.M., van DUIN C.T.M., WENSING T. (1992) - Fever and acute phase response induced in dwarf goats by endotoxin and bovine and human recombinant tumor necrosis factor alpha. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **15**: 332-342.
- VAN MIERT A.S.J.P.A.M., Van DUIN C.T.M., WOUTERSEN-VAN NIJNANTEN F.M.A. (1983) - Effect of intracerebroventricular injection of PGE<sub>2</sub> and 5HT on body temperature, heart rate and rumen motility of conscious goats. *Eur. J. of Pharmacol.*, **92**: 143-6.
- VANE J. R., BAKHLE Y. S., BOTTING R. M. (1998) - Cyclooxygenases 1 and 2. *Pharmacol. Toxicol.* **38**: 97-120.
- VASILACHE A.M., ANDERSSON J., NILSBERTH C. (2007) - Expression of PGE<sub>2</sub> EP<sub>3</sub> receptor subtypes in the mouse preoptic region. *Neurosci. Lett.*, **423**: 179-83.
- VELLUCCI S.V., PARROTT R.F. (1998) - Expression of mRNAs for vasopressin, oxytocin and corticotrophin releasing hormone in the hypothalamus, and of cyclooxygenases-1 and -2 in the cerebral vasculature, of endotoxin-challenged pigs. *Neuropeptides*, **32**: 439-46.
- VIRIYAKOSOL S., KIRKLAND T. (1995) - Knowledge of cellular receptors for bacterial endotoxina. *Clin. Infect. Dis.*, **21**: 190-195.
- WANG X.S., LAU H.Y. (2006) - Prostaglandin E potentiates the immunologically stimulated histamine release from human peripheral blood-derived mast cells through EP1/EP3 receptors. *Allergy*, **61**: 503-6.
- WARNER A., BARRY B. E., BRAIN J. (1986) - Pulmonary intravascular macrophages in sheep: morphology and function of a novel constituent of the mononuclear phagocyte system. *Laboratory Investigation*, **55**: 276-288.
- WARNER A., DECAMP M., MOLINA R., BRAIN J. (1988) - Pulmonary removal of circulating particles of circulating endotoxin results in acute lung injury in sheep. *Lab. Invest.*, **59**: 219-230.
- WARNER A., MOLINA R., BRAIN J. (1987) - Uptake of bloodborne bacteria by pulmonary intravascular macrophages and consequent inflammatory responses in sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **136**: 683-690.
- WARNER, A.E. (1996) - Pulmonary intravascular macrophages. Role in acute lung injury. *Clin. Chest Med.*, **17**: 125-35.

- WATABE A., SUGIMOTO Y., HONDA A., IRIE A., NAMBA T., NEGISHI M., ITO S., NARUMIYA S., ICHIKAWA A. (1993) - Cloning and expression of cDNA for a mouse EP<sub>1</sub> subtype of prostaglandin E receptor. *J. Biol., Chem.*, **268**: 20175-20178.
- WATANABE K., KAWAMORI T., NAKATSUGI S., OHTA T., OHUCHIDA S., YAMAMOTO H., MARUYAMA T., KONDO K., USHIKUBI F., NARUMIYA S. (1999) - Role of the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>1</sub> in colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **59**:5093-96.
- WATANABE M. (1992) - Characteristics of TNF- $\alpha$ -and TNF- $\beta$ -induced fever in rabbit. *Jpn. J. Physiol.*, **42**: 101-16.
- WIENBECK M., SPERLING T. (1984) - The effects of prostaglandins F<sub>2</sub>  $\alpha$  and E<sub>2</sub> on the motility of the cat colon in vitro. *Z. Gastroenterol.*, **22**: 580-5.
- WILBORN J., DE WITT D.L., PETERS-GOLDEN M. (1995) - Expression and role of cyclooxygenase isoforms in alveolar and peritoneal macrophages. *Am. J. Physiol.*, **268**: 294-301.
- WILLIAMS S.J., OLSON D.M., ZARAGOZA D.B., COULTER C.L., BUTLER T.G., ROSS J.T., McMILLEN I.C. (2004) - Cortisol infusion decreases rennin, but not PGHS-2, EP2, or EP4 mRNA expression in the kidney of the fetal sheep at days 109-116. *Pediatr. Res.*, **4**: 637-44.
- WINGATE D.L. (1981) - Backwards and forwards with the migrating complex. *Dig. Dis. Sci.*, **26**: 641-66.
- WINKLER G.C. (1988) - Pulmonary intravascular macrophages in domestic animal species: review of structural and functional properties. *Am. J. Anat.*, **181**: 217-34.
- WOODWARD D.F., JONES R.L., NARUMIYA S. (2011) - International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: Classification of Prostanoid Receptors, Updating 15 Years of Progress. *Pharmacological Reviews*. **63**: 471-538.
- WU K.K. (1995) - Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv. Pharmacol.*, **33**: 179-207.
- YAMAGATA K., MATSUMURA K., INOUE W., SHIRAKI T., SUZUKI K., YASUDA S., SUGIURA H., CAO C., WATANABE Y., KOBAYASHI S. (2001) - Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J. Neurosci.*, **21**: 2669-77.
- YAMATO M., NAGAHAMA K., KOTANI T., KATO S., TAKEUCHI K. (2005) - Biphasic effect of PGE<sub>2</sub> in a rat model of esophagitis mediated by EP<sub>1</sub> receptors: relation to pepsin secretion. *Digestion*, **72**: 109-118.
- YAN, E., CASTILLO-MELENDEZ, M., NICHOLLS, T., HIRST, J., WALKER, D. (2004) - Cerebrovascular responses in the fetal sheep brain to low-dose endotoxin. *Pediatr. Res.*, **55**: 855-63.
- YERMAKOVA A.V., ROLLINS J., CALLAHAN L.M., ROGERS J., O'BANION M.K. (1999) - Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **58**: 1135-46.
- YOKOYAMA Y., XU H., KRESGE N., LELLER S., SARMADI A.H., BAVEJA R., CLEMENS M.G., ZHANG J.X. (2003) - Role of thromboxane A<sub>2</sub> in early BDL induced portal hypertension. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **284**: 453-60.

- YOSHIDA K., NAKAMURA K., MATSUMURA K., KANOSUE K., KONIG M., THIEL H.J., BOLDOGKOI Z., TOTH I., ROTH J., GERSTBERGER R., HUBSCHLE T. (2003) - Neurons of the rat preoptic area and the raphe pallidus nucleus innervating the brown adipose tissue express the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub>. *Eur. J. Neurosci.*, **18**: 1848-60.
- YU Y., ZHANG Z.H., WEI S.G., SERRATS J., WEISS R.M., FELDER R.B. (2010) - Brain perivascular macrophages and the sympathetic response to inflammation in rats after myocardial infarction. *Hypertension*, **55**: 652-9.
- ZELDIN D.C., WOHLFORD-LENANE C., CHULADA P., BRADBURY J.A., SCARBOROUGH P.E., ROGGLI V., LANGENBACH R., SCHWARTZ D.A. (2001) - Airway inflammation and responsiveness in prostaglandin H synthase-deficient mice exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **25**: 457-65.
- ZHANG J., RIVEST S. (1999) - Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE<sub>2</sub> receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation. *Eur. J. Neurosci.*, **11**: 2651-68.
- ZHANG Y.H., LU J., ELMQUIST J.K., SAPER C.B. (2003) - Specific roles of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced fever and Fos expression in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **463**: 3-12.
- ZHENG J., ARIGA H., TANIGUCHI H., LUDWIG K., TAKAHASHI T. (2009) - Ghrelin regulates gastric phase III-like contractions in freely moving conscious mice. *Neurogastroenterol. Motil.*, **21**: 78-84.

